

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-248575

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04 B
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19
9/02		9/02
C 1 2 P 7/04		C 1 2 P 7/04

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-58012

(22) 出願日 平成9年(1997) 3月12日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年3月5日  
 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌71巻  
 臨時増刊号」に発表

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 三沢 典彦

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒  
 麟麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 島田 裕士

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒  
 麟麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 三浦 裕

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒  
 麟麦酒株式会社基盤技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子、およびカロチノイドの製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のペプチドをコードする遺伝子:

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつHMG-CoA レダクターゼ活性を有するペプチド。; 上記の遺伝子をカロチノイド生合成遺伝子とともに酵母に導入し、該酵母を培地に培養して培養物からカロチノイドを得ることを特徴とする、カロチノイドの製造法; カロチノイド生合成遺伝子を、酵母*Candida utilis*に導入し発現させることを特徴とする、カロチノイドの製造法; 上記の遺伝子およびカロチノイド生合成遺伝子を導入した酵母。

【効果】 本発明によれば、カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子が提供される。当該遺伝子をカロチノイド合成遺伝子群とともに酵母に導入し、同時に発現させることにより、有用なカロチノイドを大量に生産することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のペプチドをコードする遺伝子:

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつHMG-CoA レダクターゼ活性を有するペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載の遺伝子をカロチノイド生成遺伝子とともに酵母に導入し、該酵母を培地に培養して培養物からカロチノイドを得ることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【請求項3】 酵母がCandida utilisである請求項2記載のカロチノイドの製造法。

【請求項4】 カロチノイド生成遺伝子がファルネシルピロリン酸からカロチノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群である、請求項2記載の製造法。

【請求項5】 カロチノイド生成遺伝子を、酵母Candida utilisに導入し発現させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【請求項6】 カロチノイド生成遺伝子がファルネシルピロリン酸からカロチノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群である請求項5記載の製造法。

【請求項7】 カロチノイドがアスタキサンチン、リコペンまたはβ-カロチンである請求項2～6記載のカロチノイドの製造法。

【請求項8】 請求項1に記載の遺伝子およびカロチノイド生成遺伝子を導入した酵母。

【請求項9】 Candida utilisである請求項8記載の酵母。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子、およびカロチノイドの製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】カロチノイド(carotenoid、カロテノイドとも呼ばれる)とは、通常、炭素鎖が40のイソプレン骨格からなる自然界に豊富に存在する天然色素の総称である。現在までに、約600種類のカロチノイドが単離されている(Pfander, H., ed., Key to Carotenoids, Basel, Birkhauser, 1987)。カロチノイドの中でも、特に、アスタキサンチン、リコペン、β-カロチンは、赤色や黄色の天然着色料として、癌予防や免疫賦活活性を有する栄養価改善剤として、食用や飼料用にすでに実用化され、有望視されているものである(三沢典彦, カロテノイドの生理活性とバイオテクノロジー, FFIジャーナル, 169, 90-94, 1996)。

【0003】カロチノイドは、ステロール、ドリコー

ル、キノン、及びその他のイソプレノイドと途中まで共通なイソプレン基本生成経路によって合成される。アセチルCoA、アセトアセチルCoAを経て合成されたヒドロキシメチルグルタリル-CoA(HMG-CoA)は、HMG-CoAレダクターゼによりメバロン酸に変換される。図1に示すように、メバロン酸は、5-ホスホメバロン酸、5-ピロホスホメバロン酸を経た後、最初のイソプレノイドであるC<sub>5</sub>のイソペンテニルピロリン酸(IPP)が合成される。IPPは異性化反応によりジメチルアリルピロリン酸(DMAP P)に変換され、さらに、DMAPPは、C<sub>5</sub>のIPPと順次、縮合することにより、C<sub>10</sub>のゲラニルピロリン酸(GPP)、C<sub>15</sub>のファルネシルピロリン酸(FPP)、C<sub>20</sub>のゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)というふうに、炭素数を5つつつ延ばしていく(図1参照)。

【0004】カロチノイドに特異的な生成経路は、GGPPにおいてイソプレン基本生成経路から分岐する。すなわち、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエン(phytoene)が合成される。フィトエンは、不飽和化反応により、順次、二重結合が導入されることにより、フィトフルエン(phytofluene; フィトエンに二重結合1個)、ζ-カロチン(ζ-carotene; 二重結合2個)、ノイロスボレン(neurosporene; 二重結合3個)、リコペン(lycopene; 二重結合4個)に変換される。さらに、リコペンは環化反応によりβ-カロチン(β-carotene)やα-カロチン(α-carotene)に変換される。そして、β-カロチンやα-カロチンに水酸基やケトン基などが導入され、ゼアキサンチン(zeaxanthin)、ルテイン(lutein)、アスタキサンチン(astaxanthin)などの種々のキサントフィルが合成される。

【0005】一方、カロチノイドの生合成を担う遺伝子の知見も、近年大きく進展した。現在までに、多くのカロチノイド生成遺伝子が、植物常在(epiphytic)細菌Erwinia やトマト、赤ピーマンなどの植物を始めとして、光合成細菌Rhodospirillum rubrum、ラン藻Synechococcus PCC 7942、カビNeurospora crassaなど、種々の生物から単離され、それらの機能が明らかにされた(三沢典彦, 遺伝子レベルで解明されたカロチノイド生成経路, 蛋白質核酸酵素, 41, 337-346, 1996)。

【0006】植物常在細菌Erwiniaのカロチノイド生成遺伝子群は、FPPを最初の前駆体として、フィトエン、リコペン、β-カロチン、ゼアキサンチンなどの有用カロチノイドを生産させるための遺伝子を提供することができる(図2参照)(三沢典彦, 遺伝子レベルで解明されたカロチノイド生成経路, 蛋白質核酸酵素, 41, 337-346, 1996)。

【0007】これらのカロチノイド生成遺伝子を用いて適切な微生物を形質転換し発現させることによって、その微生物に、これらの有用カロチノイドの生合成能を新たに付与したり、カロチノイドの代謝経路を変えたりする種々の試みもなされている(三沢典彦, セミナー室

メタボリックエンジニアリングの展開-2. 大腸菌・酵母によるカロチノイド生産, 化学と生物, 35, 60-68, 1997, および, 三沢典彦, イソプレノイド生合成遺伝子による植物の代謝工学, 第33回植物化学シンポジウム講演要旨集, 22-32, 1997)。

【0008】例えば, FPPから $\beta$ -カロチンの生合成に必要な4つのcrt 遺伝子であるcrtE, crtB, crtI, crtYを導入することにより, 導入された微生物に $\beta$ -カロチンを産生させることができる(図2参照)。また, アスタキサンチンを産生する海洋細菌*Agrobacterium aurantia* 10 cum から得られたカロチノイド生合成遺伝子群を*Erwinia*のカロチノイド遺伝子と組み合わせ発現させることにより, 大腸菌などの微生物に, さらに, アスタキサンチン, カンタキサンチンなどを産生させることも可能となった(図2参照)(三沢典彦, 遺伝子レベルで解明されたカロチノイド生合成経路, 蛋白質核酸酵素, 41, 337-346, 1996, 及び, Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwar, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995)。

【0009】しかしながら, 遺伝子工学的試みによっても, 既存の発酵法にカロチノイドの生産量において劣るのが現状であった。たとえば,  $\beta$ -カロチンの合成に必要な4つのcrt 遺伝子, crtE, crtB, crtI, crtYを酵母*Saccharomyces cerevisiae*に導入し, 発現させても, その酵母は, わずか0.01% (100  $\mu$ g/g 乾重量)の $\beta$ -カロチンしか生産しなかった(Yamano, S., Ishii, 30 T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lyxopen in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1112-1114, 1994, 及び, Ausich, R. L., Brinkhaus, F. L., Mukharji, I., Proffitt, J. H., Yarger, J. G., Yen, H.-C. B., Biosynthesis of carotenoids in genetically engineered hosts. Patent application, PCT WO/91/13078, 1991)。これは, アスタキサンチンまたは $\beta$ -カロチンを0.05% (500  $\mu$ g/g乾重量)生産する酵母*Phaffia rhodozyma*の突然変異株と比べても, かなり劣っている(Girard, P., Falconier, B., Bricout, J., Vladescu, B., Appl. Microbiol. Biotechnol., 41, 183-191, 1994)。

【0010】一方, アスタキサンチンや $\beta$ -カロチンは, 有機合成法によっても合成される。有機合成法においては, 価格的には, 従来の発酵法によるカロチノイド生産に勝っているものの, これらのカロチノイドが飼料や食品添加剤として用いられることを考慮すると, 反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残る, また, 消費者の天然物嗜好にも反している。

【0011】従来, 有用カロチノイドの微生物生産を行うためには, もともと, そのカロチノイドを十分量合成できる微生物を探し, 培養条件の検討や突然変異処理などによって, その生産量を上げることを試みることぐらいしか検討できることはなかった。これに対して, 遺伝子工学的手法によれば, 生産菌となる微生物のカロチノイド合成能の有無にかかわらず, 増殖が容易でしかも早く, たとえ食用として用いても安全性が保証されているような微生物を, カロチノイド生産のための宿主として選ぶことを検討できる。

【0012】したがって, カロチノイド生合成遺伝子の利用して遺伝子工学的にカロチノイドを生産するにあたっては, 発現に最適な微生物を選びだし, その微生物にどこまで効率的にカロチノイドを生産させられるか, および, その微生物に最終的に蓄積するカロチノイドの含量をどこまで上げられるかということにかかっているのである。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は, カロチノイド生合成遺伝子を宿主に導入してカロチノイドを遺伝子工学的手法により生産するにあたり, 従来の発酵法に凌駕しうる生産量を上げることができ, しかも価格的には有機合成法に勝るような, 効率的なカロチノイドの製造法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは, 上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果, (1) 有用カロチノイド合成のための宿主となる微生物として, 食品・飼料用酵母である*Candida utilis* (トルラ酵母)を宿主となる微生物として選択すること, (2) またHMG-CoAレダクターゼのコア酵素部分をコードする遺伝子をカロチノイド合成遺伝子とともに*C. utilis*等のカロチノイド産生酵母に導入し, 発現させることによってその酵母のカロチノイド生産量を数倍上げることができる技術を確立し, 本発明を完成するに至った。

【0015】すなわち, 本発明は, 以下の(a)又は(b)のペプチドをコードする遺伝子:

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が付加, 欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり, かつHMG-CoA レダクターゼ活性を有するペプチドである。

【0016】本発明はまた, 上記の遺伝子をカロチノイド生合成遺伝子とともに酵母に導入し, 該酵母を培地に培養して培養物からカロチノイドを得ることを特徴とする, カロチノイドの製造法である。さらに, 本発明は, カロチノイド生合成遺伝子を, 酵母*Candida utilis*に導入し発現させることを特徴とする, カロチノイドの製造法である。さらにまた, 本発明は, 上記の遺伝子および

5

カロチノイド生成遺伝子を導入した酵母である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】

# 1. カロチノイド高生産のための検討

## (1) 宿主微生物の選択

本発明において、有用カロチノイド合成のための宿主となる微生物として、食品・飼料用酵母である *Candida utilis* (トルラ酵母) を使用する。 *C. utilis* は、米国食品医薬品局 (FDA) により、 *S. cerevisiae*、 *Kluyveromyces* 属酵母とともに食品利用が認められた数少ない安全性 (GRAS) 酵母であり、現在、日本では、医薬品・食品用グルタチオンや調味料用RNAの生産などに用いられている。また、 *C. utilis* は、 *S. cerevisiae* 同様に、安価な培地である糖蜜で増殖できるが、 *S. cerevisiae* と違って、好気的条件下においては、生育阻害の原因物質であるエタノールをまったく生成しないので、高密度培養が可能である。

【0018】カロチノイド生成遺伝子を *C. utilis* に導入することにより、カロチノイドを高生産を確認するには、例えば以下のようにして行うことができる。 *Erwinia uredovora* のリコペン合成に必要な遺伝子である *crtE*、 *crtB*、 *crtI* を、それぞれ *C. utilis* 由来のグリセルアルデヒド-3リン酸脱水素酵素 (GAP)、ホスホグリセル酸キナーゼ (PGK)、アラズマ膜ATPase (PMA) 遺伝子のプロモーターとターミネーター配列の間に組み込み、シクロヘキシミド耐性 *L41* 遺伝子を薬剤耐性マーカー遺伝子としたプラスミドを構築し、このプラスミドを *C. utilis* IFD 0988株のリボソームタンパク質をコードする *L41* 遺伝子部位内に挿入する。この薬剤耐性マーカー遺伝子を用いた *C. utilis* の形質転換法は、本発明者らによる文献 (Kondo, K., Saito, T., Kajiwara, S., Takagi, M., Misawa, N., A transformation system for the yeast *Candida utilis*: Use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J. Bacteriol.*, 177, 7171-7177, 1995) により行うことができる。

【0019】(2) カロチノイド生成遺伝子のコドン使用の改変

本発明においては、アスタキサンチン合成に関与する植物常在細菌 *Erwinia uredovora* の *crtE*、 *crtB*、 *crtI*、 *crtY* 遺伝子および海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacum* 由来の *crtZ*、 *crtW* 遺伝子の構造遺伝子の計6遺伝子についてコドン使用の改変を行う。

【0020】まず、上記6遺伝子の全てについて *C. utilis* 由来のGAP構造遺伝子のコドン使用頻度を参考に全合成を行う。合成は、作製する遺伝子において、それがコードするアミノ酸配列を全く変化させることなく、それぞれのアミノ酸をコードするコドンの種類だけを変化さ

6

せるように行う。具体的には、それぞれの遺伝子に含まれるメチオニン、およびトリプトファンを除いた18アミノ酸について、それをコードするコドンが *C. utilis* 由来のGAP構造遺伝子で多く使用されているものをなるべく使用するように設計を行う。

【0021】遺伝子の全合成は以下の方法により行うことができる。構造遺伝子を数個のセグメントに分割して合成した後、制限酵素切断部位を利用したライゲーションが可能のように、適切な制限酵素認識部位が構造遺伝子中に約250~300 bpおきに生じるように塩基配列の設計を行う。まず、設計した遺伝子の塩基配列に従って、2対の50~100塩基程度の1本鎖オリゴヌクレオチドを常法で合成し、これを鋳型とする1回目のPCR法を行い、2本鎖のセグメントを合成する。より具体的には、たとえば、図3に模式図を示したように、110 bpの2本鎖DNAを合成する場合、2本の60塩基のオリゴヌクレオチド3および3Cをそれぞれの3'末端側で約60 bpの相補鎖を形成するように合成し、このオリゴヌクレオチドを鋳型として、標準的な条件により1回目のPCR反応を行うことにより、目的の2本鎖DNAが得られる。さらに、約310 bpの2本鎖DNAを合成する場合、上述のようにして得られた2本鎖DNA、および、60塩基の2本のオリゴヌクレオチド2と2Cを用いて、2回目のPCR反応を行う。最後に、この2回目のPCRで得られた2本鎖DNA、および、60塩基の2本のオリゴヌクレオチド1と1Cを用いて、3回目のPCR反応を行い、最終的に目的とする2本鎖DNAを得る。なお、この最終的に合成された2本鎖DNAの両末端には、特異的な制限酵素部位が存在するようにデザインしており、さらに、制限酵素の消化が容易なように、両末端の制限酵素認識部位の外側に、さらに2 bp程度余分な配列が付加しておく。

【0022】(3) カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子

本発明における、カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子は、以下の(a)又は(b)のペプチドをコードする遺伝子:

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、HMG-CoA レダクターゼ活性を有するペプチドである。また、本発明における、カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子は配列番号2に示した塩基配列を有するもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0023】上記遺伝子を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりも酵母 *Candida*

utilisなどの染色体DNAまたはcDNAライブラリーを大腸菌で作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法、により、これを取得するほうが好ましい。

【0024】具体的には、まず、*Candida utilis* IFD 0988の染色体DNAを調製し、*S. cerevisiae*の2種類のHMG-CoA レダクターゼのアイソザイム (Hmg1p, Hmg2p) のうちの一つであるHmg1pのアミノ酸配列を参考にしてPCR用プライマーを合成し、この染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、*S. cerevisiae*のHMG1遺伝子と相同性のあるDNA断片を取得する。さらに、このDNA断片をプローブとして、常法にしたがって作製された*Candida utilis* IFD 0988の染色体DNAライブラリーをスクリーニングすることにより、最終的に、配列番号4に示す、全長の*C. utilis*のHMG-CoA レダクターゼ遺伝子を取得できる。この、*C. utilis*のHMG-CoAリダクターゼからN末側の膜貫通領域を除いたC末側の酵素触媒領域のみをコードする改変遺伝子が、上記のカロチノイド生産の増量に有用な遺伝子である。

【0025】2. 酵母の形質転換および遺伝子発現  
酵母への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法は、遺伝子工学の分野により慣用されているものであればいずれもよく、例えば、"Vectors for cloning genes", Methods in Enzymology, 216, p.469-631, 1992, Academic Press、および、"Other bacterial systems", Methods in Enzymology, 204, p.305-636, 1991, Academic Press 参照) に準じて実施すればよい。

【0026】酵母*Saccharomyces cerevisiae*への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊参照)。酵母での外来遺伝子の発現は、PGK やGAP(GPD)等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、*S. cerevisiae*のベクター、たとえば、YRp系(酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YEp系(酵母の2 $\mu$ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、Ylp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*". Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1112-1114, 1994参照)。

【0027】酵母*Candida utilis*への外来遺伝子の導入法については、すでに本発明者らにより開示された方法(近藤、三沢、梶原、特開平8-173170)に従って実施できる。具体的にはシクロヘキシミド耐性遺伝子、G418耐性遺伝子、あるいはハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカー遺伝子を含んだプラスミドを直鎖状にした後、電気パルス法もしくはリチウム法によって、染色体上に組み込むことができる。外来遺伝子の発現には同特許に記載されたGAP, PGK, PMAなどのプロモーターを使用することができる。

【0028】酵母*Phaffia rhodozyma*への外来遺伝子の導入法については、Van Ooyenらにより、開示された方法(Transformation of *Phaffia rhodozyma* W094/06918 Van Ooyen et al 1994)により、G418耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子を含むプラスミドをリチウム法などによって染色体上に組み込むことができる。

【0029】酵母*Candida tropicalis*への外来遺伝子の導入は、特開平4505557により開示された方法で、また、*Yarrowia lipolytica*への外来遺伝子の導入は、特開昭60199386、特開昭6121087、特開昭63164889などにより開示された方法により、それぞれ実施可能である。

【0030】(2)において全合成されたカロチノイド合成遺伝子を宿主*C. utilis*に導入することにより、カロチノイドを生産させるには、例えば以下のように行うことができる。

【0031】(リコペンの生産)(2)で合成したcrtE, crtB, crtI遺伝子をそれぞれ、*C. utilis*由来のGAP, P14, PGK遺伝子のプロモーターとGAP, PMA, PGK 遺伝子のターミネーター配列の間に挟んで、シクロヘキシミド耐性L41遺伝子を薬剤耐性マーカー遺伝子として、*C. utilis* IFD 0988株のリボソームDNA部位内に導入する。なお、P14のプロモーター配列は、すでに開示された特許明細書(特開平8-173170)に記述されている。その結果得られた*C. utilis*形質転換体は、菌体乾重量あたり1.1 mgものリコペンを生産でき、これは、コドン使用を改変する前の値の約1.5倍である。

【0032】( $\beta$ -カロチンの生産)(2)で合成したcrtE, crtI, crtB, crtY遺伝子を、GAP, PGKの外に*C. utilis*由来のP14および P57プロモーター配列(特開平8-173170参照)と、GAP, PGK, PMAのターミネーター配列の間にそれぞれ挟んで、シクロヘキシミド耐性L41遺伝子をマーカー遺伝子としたプラスミドを構築し、*C. utilis*のリボソームDNA部位内に導入する。

【0033】(アスタキサンチンの生産)(2)で合成したcrtB, crtY, crtW遺伝子を P14, PGK, GAPのプロモーター配列と、PMA, PGK, GAPのターミネーター配列の間にそれぞれ挟んでシクロヘキシミド耐性L41遺伝子をマーカー遺伝子としたプラスミドと、crtE, crtI, crtZ 遺伝子をGAP, PGK, P14のプロモーター配列と GAP, PG

K, PMAターミネーター配列の間にそれぞれ挟んでシクロヘキシミド耐性L41遺伝子をマーカー遺伝子としたプラスミドを、同時にC. utilisのL41遺伝子座に導入する(co-transformation)。

【0034】色素定量を行ったところβ-カロチン生産株については乾燥重量あたりβ-カロチン0.079%、アスタキサンチン生産株についてはアスタキサンチン0.034%であった。アスタキサンチン生産量では、同色素を生産する酵母Phaffia rhodozymaの変異処理を行う前の値(0.02~0.03%)より若干高い。また、本組換え酵母に従来法の変異処理を行うことによっても、さらにその含量を増加させることも可能である。

【0035】また、(3)の改変遺伝子を、C. utilis由来のGAP遺伝子のプロモーターとターミネーター配列の間に挟んで、ハイグロマイシン耐性遺伝子を薬剤耐性マーカー遺伝子として、リコペンを産生するC. utilis形質転換体のリボソームDNA部位に導入すると、得られたC. utilis形質転換体のリコペン生産量は改変遺伝子を導入する前の値の約4倍となる。ところが、C. utilisのHMG-CoAリダクターゼ遺伝子の全長を、同様に、リコペンを産生するC. utilis形質転換体のリボソームDNA部位に導入し発現させたものでは、リコペンの生産量の増強はほとんど見出されない。

### 【0036】3. 微生物の寄託

本発明のカロチノイド生産の増量に有用な遺伝子を含む大腸菌、および本発明によるリコペン、アスタキサンチンを生産するCandida utilisは、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。

【0037】(i) JM109 (pChGRH) (大腸菌)

寄託番号: FERM BP-5837

受託年月日: 平成9年2月25日

(ii) 0988 (pChGRH, pCLR1EBI-3) (リコペン産生Candida utilis)

寄託番号: FERM BP-5838

受託年月日: 平成9年2月25日

(iii) 0988 (pCLBWY1, pCLEI21) (アスタキサンチン産生Candida utilis)

寄託番号: FERM BP-5839

受託年月日: 平成9年2月25日

### 【0038】

【実施例】以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。なお、ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning - A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に基づいている。

【0039】〔実施例1〕リコペン生産用プラスミドpCLEBI13-2の作製

(1) crtE, crtB, crtI遺伝子のオープンリーディングフ

レームの取得

植物常在細菌Erwinia uredovoraのcrtE, crtB, 及び, crtI遺伝子のオープンリーディングフレームをコードするそれぞれのDNA断片は、プラスミド pCRA16 (Misawa, N. et al., J. Bacteriol., 172, 6704-6712, 1990) を鋳型としてPCR法によって取得した。PCR用プライマーは、オープンリーディングフレームの開始コドンから1塩基はさんで5'側にXbaI認識部位を、同じく終止コドンから1塩基はさんで3'側にBglII認識部位を付加するようにデザインした。そして、PCR反応によって得られたそれぞれの増幅断片を、XbaIとBglIIで消化後、XbaI-BglII断片としてゲルから回収を行った。crtEについてはcrtESとcrtEAを用いて、crtBについてはcrtBSとcrtBAを用いて、crtIについてはcrtISとcrtIAを用いて増幅させた。以下にそれぞれプライマーとして用いた配列を示す。

### 【0040】

crtES 5'-GGT CTA GAA ATG ACG GTC TGC GCA AAA -3'  
crtEA 5'-CCA GAT CTC TTA ACT GAC GGC AGC GAG -3'  
crtBS 5'-GGT CTA GAT ATG AAT AAT CCG TCG TTA -3'  
crtBA 5'-CCA GAT CTG CTA GAG CGG GCG CTG CCA -3'  
crtIS 5'-GGT CTA GAC ATG AAA CCA ACT ACG GTA -3'  
crtIA 5'-CCA GAT CTT TCA AAT CAG ATC CTC CAG -3'

### 【0041】(2) 各遺伝子発現カセットの作製

#### ① crtE 遺伝子発現カセットの作製

Candida utilisのグリセルアルデヒド-3リン酸脱水素酵素(GAP)遺伝子のプロモーター、ターミネーター断片は、それぞれプラスミドpGAP1(本発明者らが先に出版した特許(WO/95/32289号))を鋳型としてPCR法により取得した。プロモーターとしては、開始コドンの上流-976から開始コドン直前-1までの974 bpのDNA断片(開始コドンAを+1とする)を以下のプライマーを用いて取得した。

### 【0042】

5'-AGCGGCCGCTAGCTTACAGCGAGCACTCAATCTGCCC-3'  
5'-GGGATCCTCTAGATATGTTGTTGTAAGTGTGTTTGTATC-3'  
これらプライマーにおいては、5'側末端にNotI部位が、3'側の開始コドン直前にXbaIとBamHI部位が形成されるようにデザインした。ターミネーターとしては、終止コドンの直後+1006から+1728までの723bpのDNA断片を以下のプライマーを用いてPCR法により取得した。

### 【0043】

5'-GGGGATCCATTGTATGACTTTTATTTATGG-3'  
5'-CCCTGCAGGATAAAGCTGAAGAATAAT-3'  
これらプライマーにおいては、5'側の終止コドン直後にBamHI部位が、3'側にPstI部位が形成されるようにデザインした。

【0044】得られた2つの増幅断片は、TAKARAニングキット(Invitrogen社)を用いてpT7Blueにクローニングした。そして、これら2つのDNA断片を、それぞ

れ、NotI-BamHI断片、BamHI-PstI断片として、ゲルから単離した後、pBluescript SK-のNotIとPstI間に挿入して、プラスミドpGAPPT10を構築した。さらに、pGAPPT10のXbaI-BamHI部位に、前述したcrtE遺伝子を有するXbaI-BglII断片を挿入し、プラスミドpGAPEを作製した。その後、GAPプロモーター-crtE遺伝子-GAPターミネーターを含む2.65 kbのNotI-PstI DNA断片をゲルから回収し、crtE遺伝子発現カセットとした。

#### 【0045】② crtB遺伝子発現カセットの作製

本発明者らが先に出願した特許(WO/95/32289号)に記載されているプラスミドpPGKPT4を用い、そのプロモーター内に含まれるSphI部位(翻訳開始点より830bp上流)をKlenow断片でfill-inした後、Sse8387I (CCTGCAGG) リンカーを挿入し、プラスミドpPGKPT6を作製した。次に、前述したcrtB遺伝子を有するXbaI-BglII断片を、pPGKPT6のXbaI-BamHI部位に挿入することにより、プラスミドをpPGKBを作製した。さらに、PGKプロモーター-crtB遺伝子-PGKターミネーターを含む2.5 kbのSse8387I-NotI DNA断片をゲルから回収し、crtB遺伝子発現カセットとした。

#### 【0046】③ crtI発現カセットの作製

本発明者らが先に出願した特許(WO/95/32289号)に記載されているプラスミドpMAP1のXbaI-BamHI部位に前述したcrtI遺伝子を有するXbaI-BglII断片を挿入した。このプラスミドをpMAPIと命名した。その後、プラスマ膜プロトンATPase(PMA)のプロモーター領域とPMAターミネーターの間に挟まれたcrtI遺伝子を含む2.5 kbのNotI DNA断片をゲルから回収し、crtI遺伝子発現カセットとした。

#### 【0047】(3) リコペン生産用プラスミドpCLEBI 13-2の構築

プラスミドpCLBS10 (Kondo, K. et al. J. Bacteriol. ,177, 7171-7177, 1995)のPstI部位に、pGKB由来の2.5 kbのcrtB発現カセットであるSse8387I-NotI断片、及び、pGAPE由来の2.65 kbのcrtE発現カセットであるNotI-PstI断片を同時に挿入し、プラスミドpCLEBを作製した。次に、pCLEBのNotI部位にpPMAl由来の2.5 kbのcrtI発現カセットであるNotI断片を挿入し、目的とするプラスミドpCLEBI 13-2を得た(図4参照)。このプラスミドは、C. utilisにリコペンを合成させるためのプラスミドである。

#### 【0048】〔実施例2〕 合成遺伝子の作製

β-カロチンの合成に必要とされる植物常在細菌Erwinia uredovora由来のcrtE, crtB, crtI, crtYの4遺伝子(Misawa, N. et al., J. Bacteriol. ,172, 6704-6712, 1990)、及び、β-カロチンからアスタキサンチンの合成に必要とされる海洋細菌Agrobacterium aurantiacum由来のcrtZ, crtWの2遺伝子(Misawa, N. et al., J. Bacteriol. ,177, 6575-6584, 1995)の計6個の構造遺伝子全てについて、全合成を行った。

【0049】Candida utilis由来のグリセルアルデヒド-3リン酸-脱水素酵素(GAP)の構造遺伝子領域のコドンで、メチオニンとトリプトファン以外のコドンの特に使用率の高いものをまとめた。当該コドンを用いて6遺伝子がコードするアミノ酸配列を再度DNA配列に変換した。その際それぞれの遺伝子に含まれる各アミノ酸についてのコドンのばらつきが、極力GAPと近いものになるように、かつ約250~300 bpごとに特異的な制限酵素部位が形成され、各遺伝子がこれらの数個のセグメントによって構成されるように設計した。形成される制限酵素部位の都合上、マイナーなコドンも一部使用した。さらに構造遺伝子の翻訳開始コドン(ATG)より1塩基はさんで5'上流側にXbaI認識部位を、また翻訳終止コドンより1塩基はさんで3'下流側にBglII認識部位が形成されるように設計した。

【0050】以上の点を考慮して、crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ, crtWの6遺伝子について、それぞれ、図5~7、図8~10、図11~14、図15~17、図18~19、図20~21に示すようにそれぞれ設計を行った。またcrtE遺伝子はセグメントE-1~E-4の4セグメントによって、crtB遺伝子はセグメントB-1~B-3の3セグメントによって、crtI遺伝子はセグメントI-1~I-6の6セグメントによって、crtY遺伝子はセグメントY-1~Y-4の4セグメントによって、またcrtZ遺伝子はセグメントZ-1~Z-2の2セグメントによって、crtW遺伝子はセグメントW-1~W-3の3セグメントによってそれぞれ構成されるように設計した。各セグメントの両端には特異的な制限酵素認識部位が形成されるようにし、また同制限酵素によって各セグメントが直接消化されるように、末端の制限酵素認識部位の両端にさらに2塩基ずつ無意味な配列を付加した。各セグメントの配列を図22~24に示す。また、各セグメントの合成の際に用いたプライマーの塩基配列を図25(crtE)、図26(crtB)、図27~28(crtI)、図29~30(crtY)、図31(crtZ)、図32(crtW)に示す。以下に、各遺伝子ごとにその合成方法を詳細に示す。

#### 【0051】(1) crtE遺伝子の合成

全合成用に設計されたcrtE遺伝子の塩基配列(図5~7)を構成する4つのセグメントE-1~E-4(図22)のDNA断片の合成を行った。セグメントE-1は、両末端にXbaIとStyl部位を持つ214 bpのDNA断片で、4本の化学合成されたオリゴヌクレオチドを用いてPCR法により合成された。セグメントE-1の合成の詳細については、前述した模式図である図3のように、まず、プライマーE-1-F2、E-1-R2(図25)を用いて1回目のPCR反応を行った。PCRの条件はExTaqポリメラーゼ(宝酒造)を用い、dNTPの量をマニュアルの1/10量(dA, dG, dC, dT各20μM)で行い、94℃ 30秒、72℃ 90秒の25サイクル、あるいは94℃ 30秒、55~65℃ 60秒、72℃ 60秒の25サイクルで行った。以下に示す遺伝子合成における2本鎖DNA化のPCR反応は、プライマーの種類とDNAが異なる以外は、すべて

13

同様の条件で行った。さらに、このPCR法で得られた反応液を鋳型として、プライマーE-1-F1、E-1-R1(図25)を用い、先の条件で2回目のPCR反応を行い、214 bpの2本鎖DNAであるセグメントE-1を得た。

【0052】セグメントE-2は、両端にStyIとSacI部位を有する266 bpのDNA断片で、これも4本の化学合成されたオリゴヌクレオチドを用いて、PCR法により作られた。まず、プライマーE-2-F2、E-2-R2で1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーE-2-F1、E-2-R1で2回目のPCRを行い、266 bpの2本鎖DNA断片であるセグメントE-2を得た。セグメントE-3は、両端にSacIとHindIII部位を有する227 bpのDNA断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まず、プライマーE-3-F2、E-3-R2で1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型としてプライマーE-3-F1、E-3-R1で2回目のPCRを行い、227 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントE-4は、両端にHindIIIとBglII部位を有する250 bpのDNA断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーE-4-F2、E-4-R2で1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型としてプライマーE-4-F1、E-4-R1で2回目のPCRを行い、250 bpの2本鎖DNA断片を得た。

【0053】以上の増幅された4つのDNA断片を、それぞれ、pT7Blueベクター(Invitrogen)に、または、Klenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC118 HincIIサイトにサブクローニングした。さらに、これらの4つのDNA断片について塩基配列を決定して、設計したものと同一であることを確認した。そして、これらの断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化した後、低融点アガロースゲル(FMC BioProducts)を用いて回収を行い、さらに、 $\beta$ -Agarase-I(日本ジーン)を用いて精製を行った。

【0054】これら4つのDNA断片の接続は以下のように行った。まず、ゲルから回収されたセグメントE-1、E-2、E-3の3断片を、pBSI1KS+のXbaI-HindIII部位に同時に挿入した。このプラスミドをpcrtE123と命名した。次に、pUC12のPstI-HindIII部位をKlenow断片処理した後、BglIIリンカー(CAGATCTG)を挿入して、BglII部位が新たに導入されたベクター(pUC12Bglと命名)を作製した。これをXbaI/BglIIで消化した後、このXbaI-BglII部位に、先のpcrtE123より切り出したセグメントE-1~3を含むXbaI-HindIII DNA断片、及び、ゲルから回収されたセグメントE-4のHindIII-BglII DNA断片を同時に挿入し、crtB遺伝子の全合成を完了させた。

#### 【0055】(2) crtB遺伝子の合成

全合成用に設計されたcrtB遺伝子の塩基配列(図8~10)を構成する3つのセグメントB-1~B-3(図22)のDNA断片の合成を行った。セグメントB-1は、両端にXbaIとEcoRV部位を持つ323 bpのDNA断片で、これは化学合成された4本のオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより合

14

成された。セグメントB-1の合成の詳細については、まずプライマーB-1-2、B-1-2R(図26)を用いて、crtE遺伝子の合成方法と同様の条件で1回目のPCR反応を行った(図3参照)。このPCRで得られた反応液を鋳型として、プライマーB-1-1、B-1-1Rを用いて2回目のPCRを行い、323 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントB-2は両端にEcoRVとHindIII部位を有する332 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーB-2-2、B-2-2Rで1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーB-2-1、B-2-1Rで2回目のPCRを行い、332 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントB-3は両端にHindIIIとBglII部位を有する313 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まず、プライマーB-3-2、B-3-2Rで1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーB-3-1、B-3-1Rで2回目のPCRを行い、313 bpの2本鎖DNA断片を得た。

【0056】以上の増幅された3断片についてpT7Blueベクター(Invitrogen)に、またはKlenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC118のHincII部位にサブクローニングした。そして、これらの3つのDNA断片の塩基配列を決定して、設計したものと同一であることを確認した。次に、これらのDNA断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化したのち、低融点アガロースゲル(FMC BioProducts)を用いて回収を行い、 $\beta$ -Agarase-I(日本ジーン)で精製を行った。これら3つのDNA断片の接続は以下のように行った。すなわち、ゲルから回収されたセグメントB-1、B-2、B-3の3断片を、ベクターpUC12BglのXbaI-BglII部位に同時に挿入し、crtB遺伝子の全合成を完了させた。

#### 【0057】(3) crtI遺伝子の合成

全合成用に設計されたcrtI遺伝子の塩基配列(図11~14)を構成する6つのセグメントI-1~I-6(図22~23)のDNA断片の合成を行った。セグメントI-1は両端にXbaIとSacI部位を持つ253 bpのDNA断片で、これは、化学合成された4本のオリゴヌクレオチドから作られた。セグメントI-1を作製するために、まず、プライマーI-1-2、I-1-2C(図27)を用いて、crtE遺伝子の合成方法と同様の条件で1回目のPCRを行った。このPCRで得られた反応液を鋳型として、プライマーI-1-1、I-1-1Cを用いて2回目のPCRを行い、253 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントI-2は両端にSacIとAccI部位を有する271 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まず、プライマーI-2-2、I-2-2Cで1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーI-2-1、I-2-1Cで2回目のPCRを行い322 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントI-3は両端にAccIとHindIII部位を有する199 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーI-3-2、I-3-2Cで1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型とし



て、プライマーI-3-1, I-3-1Cで2回目のPCRを行い、199 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントI-4は両端にHindIIIとSacI部位を有する322 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーI-4-2, I-4-2Cで1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーI-4-1, I-4-1Cで2回目のPCRを行い、322 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントI-5は、両端にSacIとBstPI部位を有する253 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーI-5-2, I-5-2C (図27~28)でPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーI-5-1, I-5-1CでPCRを行い、253 bpの2本鎖断片を得た。セグメントI-6は、両端にBstPIとBglII部位を有する254 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーI-6-2, I-6-2C (図28)でPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーI-6-1, I-6-1CでPCRを行い254 bpの2本鎖断片を得た。

【0058】以上の増幅された6断片について、pT7Blueベクター (Invitrogen)、またはKlenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC118のHincII部位にサブクローニングした。これらの6断片については、塩基配列を決定して、設計したものと同一であることを確認した。次に、これらのDNA断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化した後、低融点アガロースゲル (FMC BioProducts) を用いて回収を行い、さらにβ-Agarase-I (日本ジーン) を用いて精製を行った。これら6つのDNA断片の接続は以下のように行った。すなわち、セグメントI-1, I-2, I-3の3断片を、pUC18のXbaI-HindIII部位に同時に挿入した。このプラスミドをpcrtI123と命名した。次に、ベクターpUC12BglのXbaI-BglII部位に、先のpcrtI123より単離されたセグメントI-1~I-3を含むXbaI-HindIII断片、ゲルから回収されたセグメントI-4のHindIII-SacI断片、セグメントI-5のSacI-BstPI断片、及び、セグメントI-6のBstPI-BglII断片を同時に挿入し、crtI遺伝子の全合成を完了させた。

#### 【0059】(4) crtY遺伝子の合成

全合成用に設計されたcrtY遺伝子の塩基配列 (図15~17) を構成する4つのセグメントY-1~Y-4 (図23) のDNA断片の合成を行った。セグメントY-1は、両端にXbaIとHindIII部位を持つ263 bpのDNA断片で、これは化学合成された4本のオリゴヌクレオチドから作られた。セグメントY-1の合成の詳細については、まず、プライマーY-1-2, Y-1-2Cを用いて1回目のPCR反応を行った。このPCRで得られた反応液を鋳型として、プライマーY-1-1, Y-1-1Cを用いて2回目のPCRを行い、263 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントY-2は両端にHindIIIとAccI部位を有する292 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーY-2-2, Y-2-2CでPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライ

マーY-2-1, Y-2-1CでPCRを行い、292 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントY-3は両端にAccI, StyI部位を有する341 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーY-3-2, Y-3-2CでPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーY-3-1, Y-3-1CでPCRを行い、341 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントY-4は両端にAccIとBglII部位を有する301 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まず、プライマーY-4-2, Y-4-2CでPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーY-4-1, Y-4-1CでPCRを行い301 bpの2本鎖DNA断片を得た。

【0060】以上の増幅された4断片について、pT7Blueベクター (Invitrogen)、またはKlenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC118のHincII部位にサブクローニングした。これら4断片について塩基配列を決定して、設計したものと同一であることを確認した。次に、これらの4つのDNA断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化した後、低融点アガロースゲル (FMC BioProducts) を用いて回収を行い、さらにβ-Agarase-I (日本ジーン) を用いて精製を行った。そして、ベクターpUC12BglのXbaI-BglII部位に、ゲルから回収されたセグメントY-1~Y-4の4断片を同時に挿入して、crtY遺伝子の全合成を完了させた。

#### 【0061】(5) crtZ遺伝子の合成

全合成用に設計されたcrtZ遺伝子の塩基配列 (図18~19) を構成する2つのセグメントZ-1~Z-2 (図24) のDNA断片の合成を行った。セグメントZ-1は両端にXbaIとAccI部位を持つ263 bpのDNA断片で、これは化学合成された4本のオリゴヌクレオチドから作られた。セグメントZ-1の合成の詳細については、まず、プライマーZ-1-F2, Z-1-R2 (図31) を用いて、1回目のPCR反応を行った。このPCRで得られた反応液を鋳型として、プライマーZ-1-F1, Z-1-R1を用いて2回目のPCRを行い、263 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントZ-2は両端にAccIとBglII部位を有する254 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まず、プライマーZ-2-F2, Z-2-R2で1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーZ-2-F1, Z-2-R1で2回目のPCRを行い、254 bpの2本鎖DNA断片を得た。

【0062】以上の増幅された2断片について、pT7Blueベクター (Invitrogen)、またはKlenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC118のHincII部位にサブクローニングした。これら2断片について塩基配列を決定して、設計したものと同一であることを確認した。次に、これらのDNA断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化した後、低融点アガロースゲル (FMC BioProducts) を用いて回収を行い、さらにβ-Agarase-I (日本ジーン) を用いて精製を行った。そして、pUC12BglのXbaI-BglII部位に、ゲルから回収されたセグメントZ-1~Z-2の2つのDNA断片を同時に挿入し

て、*crtZ*遺伝子の合成を完了させた。

#### 【0063】(6) *crtW*遺伝子の合成

全合成用に設計された*crtW*遺伝子の塩基配列(図20~21)を構成する2つのセグメントW-1~W-3(図24)のDNA断片の合成を行った。セグメントW-1は両端にXbaIとAccI部位を持つ250 bpのDNA断片で、これは化学合成された4本のオリゴヌクレオチドから作られた。セグメントW-1は、前述の図3のように、まず、プライマーR1-2、F1-2(図32)を用いて、*crtE*遺伝子の合成方法と同様の条件で1回目のPCR反応を行った。このPCRで得られた反応液を鋳型として、プライマーR1-1、F1-1を用いて2回目のPCRを行い、250 bpの2本鎖DNAを得た。セグメントW-2は両端にAccIとKpnI部位を有する332 bpのDNA断片で、これのみ6本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーF2-3、R2-3を用いて1回目のPCR反応を行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーF2-2、R2-2で2回目のPCRを行い、さらに新たに合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーF2-1、R2-1で3回目のPCRを行い、332 bpの2本鎖DNA断片を得た。セグメントW-3は両端にKpnIとBglII部位を有する208 bpの断片で、これも4本のオリゴヌクレオチドから作られた。まずプライマーF3-2、R3-2で1回目のPCRを行った後、合成された2本鎖DNAを鋳型として、プライマーR3-1、F3-1で2回目のPCRを行い、208 bpの2本鎖DNA断片を得た。

【0064】以上の増幅された3断片について、pT7Blueベクター(Invitrogen)、またはKlenow断片処理およびリン酸化処理を行った後にpUC18のHincII部位にサブクローニングした。これら3断片について塩基配列を決定して、設計したものと同じであることを確認した。次に、これらのDNA断片を、それぞれ、それらの末端を認識する制限酵素で消化した後、低融点アガロースゲル(FMC BioProducts)を用いて回収を行い、さらに、 $\beta$ -Agarase-I(日本ジーン)を用いて精製を行った。そして、ベクターpUC12BglのXbaI-BglII部位に、ゲルから回収されたセグメントW-1~W-3の3断片を同時に挿入して、*crtW*遺伝子の全合成を完了させた。

#### 【0065】〔実施例3〕種々の*Candida utilis*導入用ベクターの作製

(1) rDNA組み込み用ベクターpCRAL10及びpCLR1の作製 DNA組み込み用ベクターpCRAL10は以下のように構築した。本発明者らが先に出願した特許(特開平8-173170)に記載されているプラスミドpCLRE2からApaI分解により得られるribosomal DNAを含む1.2 kbの断片をpBluescript SK-のApaIサイトにクローン化してプラスミドpCRA1を構築した。pCRA1をAsp718で分解した後、Klenow断片処理によりそれぞれを平滑末端とし、NotIリンカーを付加してpCRA3を作製した。このプラスミドをNotIとBglII\*

\*で分解することにより、0.5 kbと0.7 kbのNotI-BglII断片を回収した。一方、pUC19をHindIIIとEcoRIで分解したのち、Klenow断片処理によりそれぞれを平滑末端とした後BglIIリンカーを連結して構築したプラスミドpUCBgIIIをBglII分解した後、2種類のNotI-BglII断片をクローニングしてpCRA10を構築した。マーカー遺伝子とするシクロヘキシミド耐性型L41遺伝子に関しては、DNA断片をPCRにより取得した。すなわち、-405から+974までのDNA断片を取得した(開始コドンATGのAを+1とする)。この際、遺伝子の5'側プライマー末端にはPstI部位を付加し、3'側プライマー末端にはSalIサイトをもつ様にデザインした。PCRに用いたプライマーの配列は、L41遺伝子の5'側プライマーとして、5'-CCTGCAGGAAACGTAACAAAGAGGTTTCA-3'を、3'側プライマーとして、5'-GGTCGACTCGCTTTGTGCGTGTGTCATT-3'を用いた。

【0066】また、鋳型としてはpCLRE2を用いた。増幅断片はTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてプラスミドpT7Blueにクローニングした。構築したプラスミドから断片をPstI-SalI断片として切り出してpCRA10に連結することにより、ベクターpCRAL10を構築した。

【0067】DNA組み込み用ベクターpCLR1は以下のようにつく製した。pUC19をHindIII消化した後、Klenow断片処理により平滑末端とした後NotIリンカーを連結して構築したプラスミドpUCNotIを作製した。ベクターpCLBS10(Kondo, K. et al. J. Bacteriol. 177, 7171-7177, 1995、及び、本発明者らが先に出願した特許(特開平8-173170参照))よりシクロヘキシミド耐性L41遺伝子を含むXhoI-SacI断片、pCRE2よりrDNAを含むSacI-EcoRI断片を回収し、pUCNotIのSalI-EcoRI部位に挿入することにより、ベクターpCLR1を得た。

【0068】(2) シクロヘキシミド耐性L41遺伝子組み込み用ベクターpCL10の作製 シクロヘキシミド耐性L41遺伝子組み込み用ベクターpCL10は以下のようにして作製した。本発明者らが先に出願した文献(Kondo, K. et al. J. Bacteriol. 177, 7171-7177, 1995)、及び、特許(特開平8-173170)に記載されているプラスミドpCLRE2を鋳型として、L41遺伝子をPCRにより0.7 kbのL5と0.7 kbのL3の2断片として得た。すなわち、L5PST1とL5BGLを用いてL5断片を、L3BGLとL3PSTNOTを用いてL3断片を増幅させた。増幅断片はTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてプラスミドpT7Blueにクローニングした。プラスミドをいずれもPstI、BglIIで消化して、L5断片、L3断片を得て、これらの断片をpUCBgIIIのBglII部位に挿入して、ベクターpCL10を作製した。以下に用いたPCRプライマーを記す。

#### 【0069】

L5PST1 5' CCT GCA GGA AAC GTA AAC AAA GAG GTT TCA 3'  
L5BGL 5' GAG ATC TGA TGA TGC CTG TTG ATA TTC ATC 3'

L38GL 5' GAG ATC TCT ACA ATG GCT CGT TCC CA 3'

L3PSTNOT 5' CCT GCA GGG CGG CCG CTT TTG TGC GTG TGT GCA TTT 3'

【0070】〔実施例4〕 各種合成遺伝子発現カセットの作製

(1) 合成crtE遺伝子発現カセットの作製

実施例2で得られたcrtE遺伝子を含むXbaI-BglII断片を、実施例1で得たベクターpGAPPT10のXbaI-BamHI部位に挿入した。このプラスミドをpGAPE1と命名した。その後、GAPプロモーターとGAPターミネーターの間に挟まれたcrtE遺伝子を含む2.65 kbの発現カセットをNotI-PstI

DNA断片として回収した。

【0071】(2) 合成crtI遺伝子発現カセットの作製  
実施例2で得られたcrtI遺伝子を含むXbaI-BglII断片を、実施例1で作製したベクターpPGKPT6のXbaI-BamHI部位に挿入した。このプラスミドをpPGKI1と命名した。次に、PGKプロモーターとPGKターミネーターの間に挟まれたcrtI遺伝子を含む3.1 kbの発現カセットをNotI-Sse8387 DNA断片として回収した。

【0072】(3) 合成crtB遺伝子発現カセットの作製  
本発明者らが先に出願した特許(特開平8-173170)に記載されているpPGKPT5よりPGKのプロモーター、ターミネーター領域を除き、ベクター部分のNotI断片を回収した。同断片に同じく同特許に記載してあるpPCV14のプロモーターを含むNotI-XbaI断片と、同じく同特許記載のPMAのターミネーター領域であるXbaI-NotI断片を挿入した。

【0073】このターミネーター断片は、pMAPT1(本発明者らが先に出願した特許(特開平8-173170))を鋳型としてPCRにより取得した。プライマーは、

5'-GGTCTAGAGGATCCTAAGCCGCTAATACCCC-3'

5'-GGGCGGCCGCTGCAGGCGTTCTTGAACCTATAAG-3'

を用い、5'側プライマー末端にXbaIとBamHI部位、3'側にNotI部位をそれぞれ付加して合成した。得られた増幅断片はTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてpT7Blueにクローニングしたのち、上記0.46 kbのXbaI-NotI断片を回収した。このプラスミドをpP14TIと命名した。pP14TIのXbaI-BamHI部位に実施例2で得られたcrtB遺伝子を含むXbaI-BglII DNA断片を挿入した。このプラスミドをpP14PB1と命名した。このプラスミドよりP14プロモーターとPMAターミネーターの間に挟まれたcrtB遺伝子を含む約2.4 kbの発現カセットをNotI-PstI DNA断片として回収した。

【0074】(4) 合成crtZ遺伝子発現カセットの作製  
プラスミドpP14TIのXbaI-BamHI部位に実施例2で得られたcrtZ遺伝子を含むXbaI-BglII断片を挿入した。このプラスミドをpP14PZ1と命名した。このプラスミドよりP14プロモーターとPMAターミネーターの間に挟まれたcrtZ遺伝子を含む発現カセットを約1.9 kbのNotI-PstI DNA断片として回収した。

【0075】(5) 合成crtY遺伝子発現カセットの作製

\* 合成crtB発現カセット作製に用いたプラスミドpP14TIよりプロモーター領域であるNotI-XbaI断片を除去し、代わりに本発明者らが先に出願した特許(特開平8-173170)に記載してあるpPCV57のプロモーターを約0.9kbのNotI-XbaI断片として単離し、同部位に挿入した。このプラスミドをpP57TIと命名した。pP57TIのXbaI-BamHI部位に実施例2で得られたcrtY遺伝子のXbaI-BglII断片を挿入した。このプラスミドをpP57PY1と命名した。このプラスミドよりP57プロモーターとPMAターミネーターの間に挟まれたcrtY遺伝子を含む約2.5 kbの発現カセットをNotI-PstI DNA断片として回収した。

【0076】また同じくcrtY遺伝子のXbaI-BglII断片を、pPGKPT6のXbaI-BamHI部位に挿入した。このプラスミドをpPGKY1と命名した。このプラスミドよりPGKプロモーターとPGKターミネーターの間に挟まれたcrtY遺伝子を含む発現カセットを約2.8 kbのNotI-Sse8387I断片として回収した。

【0077】(6) 合成crtW遺伝子発現カセットの作製  
実施例2で得られたcrtWのXbaI-BglII断片を、pGAPPT10のXbaI-BamHI部位に挿入した。このプラスミドをpGAPW1と命名した。その後、GAPプロモーターとGAPターミネーターの間に挟まれたcrtW遺伝子を含む約2.45 kbの発現カセットをNotI-PstI断片として回収した。

【0078】〔実施例5〕 合成遺伝子を用いたリコベン、β-カロチン、アスタキサンチン生産用プラスミドの作製

(1) 合成遺伝子を用いたリコベン生産用プラスミドpCLR1EBI-3の作製

実施例3で得られたCandida utilis導入用ベクターpCLR1と、実施例4で得られたcrtE、crtB、crtI遺伝子各種発現カセットを用いてリコベン生産用プラスミドpCLR1EBI-3の作製を行った(図33参照)。

【0079】まず、pCLR1のPstI-NotI部位にpP14PB1由来のcrtB遺伝子発現カセットである2.4 kbのPstI-NotI断片を挿入し、プラスミドpCLR1Bを作製した。次に、pCLR1BのNotI部位に、pGAPE1由来のcrtE遺伝子発現カセットである2.65 kbのNotI-PstI断片と、pPGKI1由来のcrtI遺伝子発現カセットである3.1kbのSse8387I-NotI断片を同時に挿入し、目的とするプラスミドpCLR1EBI-3を作製した。

【0080】(2) 合成遺伝子を用いたβ-カロチン生産用プラスミドpCRAL10EBIY-3の作製

実施例3で得られたC. utilis導入用ベクターpCRAL10と、実施例4で得られたcrtE、crtB、crtI、crtY遺伝子各種発現カセットを用いてβ-カロチン生産用プラスミドpCRAL10EBIY-3の作製を行った(図34参照)。

【0081】まず、pCRAL10をNotIで消化した後、Kleno断片処理後ライゲーション反応を行い、プラスミドpCR

AL10-2を作製した。次に、pCRAL10-2のPstI部位に、pP57PY1由来のcrtY遺伝子発現カセットである2.5 kbのNotI-PstI断片と、pP14PB1由来のcrtB遺伝子発現カセットである2.4 kbのNotI-PstI断片を同時に挿入し、プラスミドpCRAL10BYを得た。さらに、pCRAL10BYのNotI部位に、pGAPE1由来のcrtE遺伝子発現カセットである2.65 kbのNotI-PstI断片と、pPGK11由来のcrtI遺伝子発現カセットである3.1 kbのSse8387I-NotI断片を同時に挿入し、目的とするプラスミドpCRAL10EB1Y-3を作製した。

【0082】(3) 合成遺伝子を用いたアスタキサンチン生産用プラスミドpCLEI21、pCLBWY1の作製  
実施例3で得られた*C. utilis*導入用ベクターpCL10と、実施例4で得られた各種crt遺伝子発現カセットを用いてアスタキサンチン生産用プラスミドpCLEI21、pCLBWY1の作製を行った(図35、36参照)。まず、図35に示すように、pCL10のPstI-NotI部位に、pP14PZ1由来のcrtZ遺伝子発現カセットである1.9 kbのPstI-NotI断片を挿入し、プラスミドpCLZ1を作製した。次に、pCLZ1のNotI部位に、pGAPE1由来のcrtE遺伝子発現カセットである2.65 kbのNotI-PstI断片と、pPGK11由来のcrtI遺伝子発現カセットである3.1 kbのSse8387I-NotI断片を同時に挿入し、目的とするプラスミドpCLEI21を作製した。

【0083】また、図36に示すように、pCL10のPstI-NotI部位に、pPGKY1由来のcrtY遺伝子発現カセットである2.8 kbのSse8387I-NotI断片を挿入し、プラスミドpCLY1を作製した。次に、pCLY1のNotI部位に、pP14PB1由来のcrtB遺伝子発現カセットである2.4 kbのNotI-PstI断片と、pGAPW1由来のcrtW遺伝子発現カセットである2.45 kbのPstI-NotI断片を同時に挿入し、目的とするプラスミドpCLBWY1を作製した。

【0084】〔実施例6〕 リコペン、 $\beta$ -カロチンおよびアスタキサンチン生産株の作製

(1) 各種プラスミドによる*Candida utilis*の形質転換  
リコペンを生産する*Candida utilis*を作製するために、実施例1で作製したリコペン生産用プラスミドpCLEBI13-2をAflIIIで消化したものを用いて、*Candida utilis* IF 0 0988株(ATCC9950)の形質転換を行った。形質転換法は、先に出願した特許(特開平8-173170)に記載された電気パルス法に従って行った。パルス条件は電気容量を25  $\mu$ F、抵抗値を1000オーム、電圧を5 KV/cmであった。

【0085】実施例5で作製した合成遺伝子を用いたリコペン生産用プラスミドpCLR1EBI-3、及び、同じく実施例5で作製した $\beta$ -カロチン生産用プラスミドpCRAL10EB1Y-3についても、これらをBglIIで消化したものを用いて、前述した条件と同様に形質転換を行った。アスタキサンチン生産株作製については、実施例5で作製したアスタキサンチン生産用プラスミドpCLEI21、pCLBWY1の両方を制限酵素BglIIで分解した後、よく混合し、同様に形質転換を行った。

【0086】(2) 各種*Candida utilis*形質転換体の培養

シクロヘキシミド耐性で選択されたクローンのうち、色相の濃いものを選択し、シクロヘキシミド 40  $\mu$ g/mlを含むYPD培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)10mlを含む試験管で、30°C、150rpmで48~72時間、前培養を行い、さらに同培地100 mlを含むイボ付きコルベン(500ml)に移し、さらに60~72時間、本培養を行った後、定常期に達した菌体を得た。菌体を遠心分離により集菌後、水で洗浄した後、凍結乾燥を行った。得られた乾燥菌体の重量を測定した後、乾燥菌体は、以下の実験に用いるまで遮光下、-80°Cで保存した。

【0087】(3) 生産されたカロテノイド色素の同定および定量

乾燥菌体に2mlの0.45 M Sorbitol, 25 mM EDTA (pH8.0)を加えて懸濁した。次に100  $\mu$ lのZymolyase 100T (25mg/ml)(キリンビール)を加えて、30°Cで60分保温した。さらに、溶液にグラスビーズ(425-600 microns, Acid-Washed, SIGMA)を加え、3分間ボルテックスした後、10 mlのアセトンを加えて1分間ボルテックスをした。上清を新しい容器に移した。残った沈殿物に10 mlの石油エーテルを加えて1分間ボルテックスを行い、上清を、先程アセトン抽出の上清を加えた容器に加えた。この石油エーテル抽出を色素が抽出されなくなるまで繰り返した。抽出溶液を5,000rpm 5分間遠心分離し、2層に別れた上層をロータリーエバポレーターで乾燥させた。乾燥色素を10 mlのクロロフォルムで溶解した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、色素の同定及び定量を行った。HPLCの条件は、カラムとして、ノバパックHR 6 $\mu$  C<sub>18</sub> (3.9 X 300 mm)(ウォーターズ社製)を用い、アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール(90/6/4)で展開した。この条件でのリコペン、 $\beta$ -カロチン、アスタキサンチンの保持時間は、それぞれ、32分、63分、53分であった。色素の同定は、この保持時間の一致と吸収スペクトルの一致により行われた。色素の定量は、リコペン、 $\beta$ -カロチン、アスタキサンチンの標品(それぞれ、Sigma社、Sigma社、Roche社から入手)を用いて作製されたHPLCのピーク面積からの定量式により行われた。なお、アスタキサンチンの同定、定量の場合には、前述したHPLCの条件では、 $\beta$ -カロチン以降のアスタキサンチン生合成中間体のキサントフィル(4-ケトゼアキササンチン、フェニコキササンチン等)が、アスタキサンチンのピークの近くに出てきて、区別しにくくなる可能性がある。そこで、アスタキサンチンの同定、定量を行う時は、さらに、キサントフィルの同定、定量に適した横山らの条件(Yokoyama, A, Miki, W., FEMS Microbiol. Lett. 128, 139-144, 1995)に従ってHPLCを行うことにより、相当ピークがアスタキサンチンであることを確認した。

【0088】プラスミドpCLEBI13-2が導入された*Candida utilis*形質転換体は、乾燥重量1gあたり760  $\mu$ g (0.076%) のリコペン含量を生産していることがわかった。これは、発明者らが先に行った*Saccharomyces cerevisiae*の形質転換体(crtE, crtB, crtIを、それぞれ、PGK, GAP (GPD), GAL7のプロモーターを用いて発現させている)によるリコペンの生産量である113  $\mu$ g/g乾燥重量(Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1112-1114, 1994)の7倍の値である。

【0089】また、合成遺伝子を有するリコペン生産用プラスミドpCLR1EBI-3が導入された*C. utilis*形質転換体(12-2株)は、乾燥重量1gあたり1.1  $\mu$ g (0.11%) のリコペンを生産することがわかった。これは、pCLEBI13-2が導入された*C. utilis*形質転換体の1.5倍の値であった。また、同じく合成遺伝子を有する $\beta$ -カロチン生産用プラスミドpCRAL10EBIY-3が導入された*C. utilis*形質転換体は、乾燥重量1gあたり790  $\mu$ g (0.079%)の $\beta$ -カロチンを生産することがわかった。

【0090】さらに、合成遺伝子を有するアスタキサンチン生産用プラスミドpCLBWY1、pCLEIZ1の両方が導入された*C. utilis*形質転換体は、主要カロテノイドとして、アスタキサンチンと $\beta$ -カロチンを生産することがわかった。乾燥重量1gあたりの生産量は、それぞれ、アスタキサンチン 340 $\mu$ g (0.034%)、 $\beta$ -カロチン 360 $\mu$ g (0.036%)であった。アスタキサンチンの生産量は、現在、実際に商業生産に使われている同色素を生産する酵母*Phaffia rhodozyma*の野生株の値(0.02~0.03%) (Johnson, E. A., An, G.-H., Critical Reviews in Biotechnol. 11, 297-326, 1991)より若干高かった。

【0091】尚、上記のpCLBWY1、pCLEIZ1の両プラスミドを導入した*Candida utilis* IFO 0988株(ATCC9950)は、0988 (pCLBWY1、pCLEIZ1)と命名し、工業技術院生命工業技術研究所に、平成9年2月25日付けてFERM BP-5839として寄託した。

【0092】〔実施例7〕*Candida utilis*から3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム Aレダクターゼ遺伝子のクローニング

(1) 部分長hmg1の取得  
特開平8-173170 (0105)で示した方法に従って、*Candida utilis* IFO 0988 (ATCC9550株)の染色体DNAを調製した。

【0093】この染色体DNAを鋳型として、ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム A(HMG-CoA)レダクターゼ遺伝子hmg1の一部を含むDNA断片をPCR法により取得した。プライマーとして、図37に示した*Saccharomyces cerevisiae*のHMG-CoA レダクターゼ遺伝子(Anderson, M. S., Muehlbacher, M., Street, I. P., Proffitt, J.

Poulter, C. D., J. Biol. Chem. 264, 19169-19175, 1989)の807から814番目までのアミノ酸配列 GDAMGMNMをコードすると考えられる塩基配列に対応するプライマー: 5'-GGTGAYGCHATGGGTATGAACAT-3'、および、同じく951から959番目までのアミノ酸配列 MPSIEVGIをコードすると考えられる塩基配列の相補的な塩基配列に対応するプライマー: 5'-GTACCVACCTCGATNSWTGGCAT-3'を用いた(YはC或いはTの配列を示す。HはA、C或いはTの配列を示す。VはA、C或いはGの配列を示す。NはA、C、G或いはTの配列を示す。SはC或いはGの配列を示す。WはA 或いはTの配列を示す)。

【0094】PCR反応はLA PCRキットVer.2 (宝酒造)を用いて、30サイクル行い、約500bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片はpT7Blue T-Vector (Novagen)にDNA Ligation kit Ver.2 (宝酒造)を用いて結合し、プラスミドpTH5を構築した。得られたpTH5の挿入断片部分について、アプライドバイオシステムズ(株)の蛍光プライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、自動DNAシークエンサーを用いて塩基配列を決定した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列6種類のうち一つが*S. cerevisiae*のHMG-CoA レダクターゼ遺伝子(hmg1)のアミノ酸配列と67%のホモロジーが観察された。

【0095】次に、pTH5より*C. utilis*のhmg1の一部を含むDNA断片をKpnI、AccIで処理して、約500 bpのDNA断片として取り出した。特開平8-173170 (0111)で得られた*C. utilis*染色体DNAライブラリーを用いて、約100,000コロニーについて、Molecular Cloning 2nd edition (Sambrook et.al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)のp12.21-23に従ってフィルターを作製し、pTH5より調製した*C. utilis*のhmg1の一部を含む約500 bpのDNA断片、KpnI-AccI断片を32P標識し、これをプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、8個のポジティブクローンと思われるクローンが得られた。得られたクローンのうち一つを選び出してBamHI処理して約4.5 kbのDNA断片として取り出し、BluescriptII SK-のBamHIに組み込んでpBH-6を構築した。同様にBluescriptII KS+のBamHIに組み込んでpHK-8を構築した。

【0096】(2) pBH-6とpHK-8のhmg1を含むDNA断片の塩基配列決定

pBH-6とpHK-8はApaIとSalIで処理して、double-stranded Nested Deletion Kit (ファルマシア バイオテック)を用いて欠失変異体を作製することにより、種々の欠失変異を持つプラスミドを作製し、4,307 bpからなるBamHI断片の塩基配列を決定した。塩基配列より推定されるアミノ酸配列を用いて、*S. cerevisiae*のHMG-CoAレダクターゼのアミノ酸配列との比較を行ったところ、pBH-6、pHK-8ともに、HMG-CoAレダクターゼ遺伝子の3'末端約250 bpが含まれていなかった。

【0097】(3) hmg1の3'領域のクローニング

特開平8-173170 (0111)で得られた*C. utilis*染色体DNAライブラリーを鋳型としてhmg1の3'領域をPCR法で取得した。プライマーとして、プラスミドpBH-6とpHK-8の塩基配列の+2032から+2061に対応する塩基配列(配列番号2)と、その5'側にGGGとEcoRI部位のGAATTCを結合させたプライマー: 5'-GGGGAATTCAGAAAGCCTTCACTCTACTTCCAGATT-3'と特開平8-173170 (0111)で得られた*C. utilis*染色体DNAライブラリーに使用しているベクターであるpBR322のBamHI部位から5から34残基離れた部位に対応する塩基配列と相同のプライマー: 5'-GACTACGCGATCATGGCGACACACCGTC-3'を用いた。

【0098】PCRはLA PCRキットVer.2 (宝酒造)を使い、30サイクル行った。PCR合成したDNA断片はpT7Blue T-Vector (Novagen)にDNA Ligation kit Ver.2 (宝酒造)を使い結合し、プラスミドpHMG-B1, pHMG-B2, pHMG-B3, pHMG-B7を構築した。得られたプラスミドの挿入断片部分について塩基配列を決定した結果、すべて同じ塩基配列からなり、得られたプラスミドは全てhmg1の3'末端を含んでいた。以上の結果から、*C. utilis*の全長のHMG-CoA レダクターゼ遺伝子(hmg1)のクローニングに成功した。

【0099】配列番号3に、*C. utilis*のHMG-CoA レダクターゼ(全長)のアミノ配列を示す(矢印のところから始まるのが配列番号1のコア酵素部分である。ただし、矢印のRはMに変換されている。)。また、配列番号4に、*C. utilis*のHMG-CoA レダクターゼ遺伝子の塩基配列、およびコードされるタンパク質のアミノ酸配列を示す(矢印のところから始まるのが配列番号2のコア酵素部分である。ただし、矢印のRはMに、CGTはATGに変換されている。)。20

【0100】*C. utilis*のhmg1には、2,805 bpからなるオープンリーディングフレームが存在した。それから推定される遺伝子産物である酵素のアミノ酸配列について、*S. cerevisiae*のHMG-CoAレダクターゼタンパク質との同源性を調べた。その結果、全配列領域では、*C. utilis*と*S. cerevisiae*間で52.2%のホモロジーが観察された。また、*C. utilis*のHMG1タンパク質におけるアミノ酸配列477残基以降の領域と、*S. cerevisiae*のHMG1タンパク質におけるアミノ酸配列573残基以降の領域におけるアミノ酸配列の同源性は75.5%と比較的高いものであった。この領域は、HMG-CoAレダクターゼのコア酵素部分であると考えられる。

【0101】〔実施例8〕hmg1高発現用プラスミドの構築

実施例1で示したプラスミドpGAPPT10を用いて*Candida utilis*の染色体中に導入されてhmg1を高発現するようなベクターを構築した(図38参照)。まず、PCR法により、hmg1の447アミノ酸から934アミノ酸までをコードしているDNA断片を取得した。プライマーとして、配列番号4の塩基配列+1339から+1368に対応する配列と、その

5'側に開始コドンであるATGを、その開始コドンの5'側にNheI部位を、そのNheI部位の5'側に塩基配列GGGを持つようにデザインしたプロンプ: 5'-GGGCTAGCATGATCATACCACAAGATTGGAGGATGCAATC-3'と、配列番号4の終始コドンを含む塩基配列+2779と+2805の間の塩基配列の相補鎖に対応する配列と、その5'側にBglII部位を、そのBglII部位の5'側に塩基配列GGGを持つようにデザインしたプロンプ: 5'-GGGAGATCTTGCTTATTCTTAGCAGCGGCTCTGTGTG-3'を用いた。PCRはLA PCRキットVer.2 (宝酒造)を使い、30サイクル行った。

【0102】得られたDNA断片をNheIとBglIIで消化後、pGAPPT10のXbaI-BamHI部位に挿入して、プラスミドpChGを作製した。

【0103】次に、特開平8-173170 (0112)で構築したpCRE2よりApaI処理して、1.2 kbのrDNA断片をプラスミドpBluescript SK-に挿入したプラスミドpCRA1を構築した。次に、pCRA1のAspI部位をNotI部位に改変したプラスミドpCRA3を構築した。さらに、このpCRA3をNotI消化後、122 kbのrDNA断片を単離し、pChGをNotI処理後、脱リン酸化したものと結合し、プラスミドpChGRを作製した。

【0104】さらに、特開平8-173170(0216)で構築したpGKHPT1よりNotI消化後、ハイグロマイシン耐性遺伝子であるL41タンパク質をコードしている3.2 kbの断片を取り出し、pChGRをNotI処理後、脱リン酸化したものと結合することにより、目的とするプラスミドpChGRHを構築した。なお、このpChGRHを導入した*E. coli* JM 109は、JM109 (pChGRH)と命名し、工業技術院生命工業技術研究所に、平成9年2月25日付けてFERM BP-5837として寄託した。

【0105】〔実施例9〕hmg1高発現用プラスミドの*Candida utilis*への導入および色素定量  
実施例8で得たプラスミドpChGRHをBglII処理したものをを用いて、特開平8-173170の実施例11の方法に従って、実施例6で得られた合成遺伝子を有するリコベン生産用プラスミドpCLR1EBI-3が導入された*C. utilis*形質転換体であるリコベン蓄積株(12-2株)の形質転換を行った。パルス条件は25μFで抵抗値を1,000オームと800オーム、電圧を5 kV/cmと4 kV/cmの計4種類で行った。用いたpChGRHは一つの条件で5 μgを用いた。電気パルス後の培養は10時間行い、シクロヘキシミド40 μg/ml、ハイグロマイシン800 μg/mlを含むYPD寒天培地上にプレーティングし、30℃で1週間培養した。その結果、濃い赤色を示すコロニーが得られた。これらの濃い赤色コロニーには、pChGRHとpCLR1EBI-3との両プラスミドが導入されていた。また、この両プラスミドを導入した*Candida utilis* IFO 0988株(ATCC9950)は、0988(pChGRH, pCLR1EBI-3)と命名し、工業技術院生命工業技術研究所に、平成9年2月25日付けてFERM BP-5838として寄託した。

27

【0106】これらの得られた濃い赤色コロニーより3株(h-3, h-8, h-17と呼ぶ)を選んで、シクロヘキシミド40 $\mu$ g/ml、ハイグロマイシン800 $\mu$ g/mlを含むYPD培地200 mlが入っている500 mlの坂口フラスコで培養した。培養条件は30 $^{\circ}$ Cで120 rpmで振とう培養であった。得られた培養液90 mlを用い、5000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分間遠心して上清を取り除いた。得られた菌体を-80 $^{\circ}$ Cで凍結し、その後に凍結乾燥器で凍結乾燥を行った。得られた乾燥菌体の重量を測定した。

【0107】次に、実施例6 (3)「カロテノイド色素の10 同定および定量」に示された方法に従って、乾燥菌体からリコペンを精製し、リコペンの定量を行った。この結果を図39に示した。コントロール (12-2) の0.11%に比べ、*C. utilis*のHMG-CoA レダクターゼのコア酵素部分(触媒領域)をコードする遺伝子が導入された株は、4倍量のリコペンを生産することができた。h-3株では、リコペンの生産量は、乾重量1gあたり4.5 mg/ml (0.45%)に達した。実施例では、リコペンの例のみを示す \*

```

1
MIHTTRLEDAIELKKPKKKASKTAVSVPKAVVVKDSEITTKSSEILHSSE
50
SESEQSSRPLEQVIELYKDGKVKTLVDDEVVSLVTAGKLPYALEKQLGD
100
NLRVAIRRRKAISDLADAPVLRNKLPHYLDYDRVFGACCENVIGYMP
150
FVGVGAGPLIIDGKPHYHIPMATTEGCLVASAMRGCKAINLGGGVTTVLTKD
200
GMTRGPCVKFP SLK RAGQCKLWLDSDGQEEMKKA FNSTSR FARLOHLQT
250
ALAGDLLFIRFRTVTGDAMGMNMISKGVYALKQMTVEVFGWDDMMVVSVS
300
GNYCTDKKPAAVNWINGRGKSVVAEASIPKDAVVKVLKSSVKAVVDVNVN
350
KNLIGSAMAGSVGGFNAQAANMVTAVYLALGQDPAQNVESNCITLMTET
400
EDGDLKVSVMSPSIEVGTIGGGTILDPQGSMLLELLGVRGPADVPGENARQ
450
LAKIVASIVLSGELSLVSALAAGHLVQSHMQHNRAAAKK*
489

```

【0110】配列番号: 2  
配列の長さ: 1470  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 二本鎖

※トポロジー: 直鎖状  
40 配列の種類: Genomic DNA  
配列

※

28

\*が、同様に、*C. utilis*のHMG-CoA レダクターゼのコア酵素部分(触媒領域)をコードする遺伝子を導入することによって、アスタキサンチンや $\beta$ -カロチンの生産量を増量させることが可能である。

【0108】

【発明の効果】本発明によれば、カロチノイド生産の増量に有用な遺伝子が提供される。当該遺伝子をカロチノイド合成遺伝子群とともに酵母に導入し、同時に発現させることにより、有用なカロチノイドを大量に生産することができる。

【0109】

【配列表】

配列番号: 1  
配列の長さ: 489  
配列の型: アミノ酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: ペプチド  
配列

1 29 60  
ATGATCCATACCACAAGATTGGAGGATGCAATCGAATTGAAAAAGCCAAAGAAGAAAGCT  
M I H T T R L E D A I E L K K P K K K A  
20  
120  
TCGAAGACAGCTGTCAGTGTTCCTAAAGCTGTTGTGGTTAAAGATTCAGAAACTACAAAA  
S K T A V S V P K A V V V K D S E T T K  
40  
180  
TCCTCGGAAATCTTGCACTCATCTTCTGAGAGTGAATCTGACCAATCTTCACGTCCACTT  
S S E I L H S S S E S E S E Q S S R P L  
60  
240  
GAACAAGTTATTGAGTTATACAAGGATGGTAAAGTTAAGACCCTTGTGACGATGAAGTT  
E Q V I E L Y K D G K V K T L V D D E V  
80  
300  
GTATCCCTTGTTACTGCTGGTAAGTTACCACTGTATGCTCTAGAGAAACAATTGGGTGAT  
V S L V T A G K L P L Y A L E K Q L G D  
100  
360  
AACTTGAGAGCCGTGCTATTTCGTGCGAAAGCCATCTCTGATCTTGCGAGATGCTCCAGTC  
N L R A V A I R R K A I S D L A D A P V  
120  
420  
TTGAGAAGCAATAAATTACCATACTTGCACTATGATTACGATCGTGTATTTGGTGCATGT  
L R S N K L P Y L H Y D Y D R V F G A C  
140

【0111】



31

480  
TGTGAAAAATGTTATCGGTTACATGCCATTACCAGTCGGTGTGCTGGTCCATTGATTATT  
C E N V I G Y M P L P V G V A G P L I I  
160  
540  
GATGGCAAGCCGTACCATATTCCAATGGCAACCACAGAGGGTTGTCTTGTGCTTCTGCT  
D G K P Y H I P M A T T E G C L V A S A  
180  
600  
ATCGCTGGTTGTAAAGCCATTAACTCTTGGTGGCGGTGTAACAACGGTTTGGACTAAAGAT  
M R G C K A I N L G G G V T T V L T K D  
200  
660  
GGTATGACGCGTGGACCATGTGTTAAATTCCTAAGTTTCAAACGAGCAGGTCAATGTAAG  
G M T R G P C V K F P S L K R A G Q C K  
220  
720  
CTATGGTTGGACTCCGATGAGGGCCAAGAAGAAATGAAGAAAGCCTTCAACTCTACTTCC  
L W L D S D E G Q E E M K K A F N S T S  
240  
780  
AGATTTGCCAGACTCCAACATTTGCAAACCTGCTCTTGCGGGTGACTTGTGTTCATTGCT  
R F A R L Q H L Q T A L A G D L L F I R  
260  
840  
TTCAGAACCGTCACTGGTGATGCTATGGGTATGAATATGATTTCCAAAGGTGTTGAATAT  
F R T V T G D A M G M N M I S K G V E Y  
280  
900  
GCTCTTAAACAAATGACCGAGGTGTTTGGATGGGACGATATGATGGTGTCTCTGTTCT  
A L K Q M T E V F G W D D M M V V S V S  
300  
960  
GGTAACTACTGTACCGATAAAAAACCAAGCTGCTGTAACTGGATCAATGGTGGTGGTAAA  
G N Y C T D K K P A A V N W I N G R G K  
320  
1020  
AGTGTGTGTCGCGAGGCTTCCATACCAAGGATGCTGTGTTAAAGTTTGAAGTTTCT  
S V V A E A S I P K D A V V K V L K S S  
340  
1080  
GTTAAAGCTGTTGTTGATGTTAATGTCAACAAGAACTTGATCGGATCAGCTATGGCTGGT  
V K A V V D V N V N K N L I G S A M A G  
360  
1140  
AGTGTGGTGGTTTCAATGCCCAAGCTGCTAATATGTTACCGCAGTTTATTGGCTTTG  
S V G C F N A Q A A N M V T A V Y L A L  
380

[0112]

33

34

1200

GGTCAAGATCCAGCCCCAAAACGTTGAATCTTCCAACTGTATTACACTAATGACTGAAACG

G Q D P A Q N V E S S N C I T L M T E T

400

1260

GAGGACGGAGATTGAAAGTTTCTGTTTCCATGCCATCTATTGAAGTCGGAACCATTTGGT

E D G D L K V S V S M P S I E V G T I G

420

1320

GGTGTTACCATCTTGGACCCACAGGGATCCATGCTTGAACCTTCTCGGAGTACGTGGACCA

G G T I L D P Q G S M L E L L G V R G P

440

1380

GCTGATGTTCCAGGAGAAAATGCCCGTCAACTGGCTAAAATCGTTGCATCTATTGTTCTT

A D V P G E N A R Q L A K I V A S I V L

460

1440

TCCGGTGAATTATCGCTAGTTAGCGCACTTGCAGCTGGTCATTTGGTGCAGAGTCATATG

S G E L S L V S A L A A G H L V Q S H M

480

1470

CAGCACAAACAGAGCCGCTGCTAAGAAATAA

Q H N R A A A K K \*

489

【0113】配列番号: 3

配列の長さ: 934

配列の型: アミノ酸

\* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

\* 配列

1

50

MFYHGASANQHWIAVDLDSKVPVDVDHYNVVPFQFRAGEYKEPVLSGIV

100

ELDEVKPVVSQSDAAEQWQLTAEDGTVWRSRAYEGKLGKYSIMAVGAFN

150

KVLNLVRGAETFDIALVTCAYIAMPYTLFNLPRMRAVGSKVWLGLSTLV

200

SSFFAFLFALYTTTRVLDLSIPFLSLSEGIPFFVAVVGFNNKILLAERVL

250

QNQLNAQSSKNDAPTVLVQALREQGPLLLRDHLEMITAFLGCSFYASYLD

300

GLKNFCILAALTLAFDILTSTFLSAILSLKLEINQLHRSTLLREQLDD

350

GLTETVDDVLKSNSLAGTKTFTDAPSTLVTVAKVAGVSVFFGLHFYGF

400

SAWLSDSL SAGNETNDTFTLYDAVADQIPIGSNGTLVTLFPTRFFLPEKLS

↓ 450

TQIEAVVLSF IGLISTAARDKYISKFILFAFVSASINVYLLNVAIHHT

500

RLEDATIELKKPKKASKTAVSVPKAVVVKDSETTKSSEILHSSSESESEQ

550

【0114】

35 36  
SSRPLEQVTELYKDGKVKTLVDDEVVSLVITAGKLPLYALEKQLGDNLRV  
600  
AIRRKALISDLADAPVLRSNKLPYLHYDYDRVFGACCENVIGYMPLPVGVA  
650  
GPLIIDGKPYHIPMATTEGCLVASAMRGCKAINLGGGVTTVLTKDGMTRG  
700  
PCVKFPPSLKRAGQCKLWLDSDGQEEMKAFNSTSRFARLQHLQTALAGD  
750  
LLFIRFRTVTGDAMGMNISKGVYALKQMTVEFGWDDMMVSVSGNYCT  
800  
DKKPAAVNWINGRGKSVVAEASIPKDAVVKVLKSSKAVVDVNVNKNLIG  
850  
SAMAGSVGGFNAQAANMVTAVYLALGQDPAQNVSSNCITLMTETEDGDL  
900  
KVSVMPSIEVGTIGGGTILDPQGSMLLELLGVRGPADVPGENARQLAKTV  
934  
ASTVLSGELSLVSALAAGHLVQSHMQHNRAAAKK\*

【0115】配列番号: 4

配列の長さ: 2820

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

20\*トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列

\*

37  
-60 -1  
CTGGCGGTGGTGCACAGTATATGAGCAACGGGTTCTCCTACGATGAACCGGCAGCGGTT  
1 60  
ATGTTCTACCACGGTGCAAGCGCAAACCAACATTGGATTGCAGTTGACGACTTGAGCAAA  
M F Y H G A S A N Q H W I A V D D L S K  
20  
120  
GTCCAGTGGATGTGGACCACTACAACGTTGTCCCATTCCAGTTCCGCAGAGCTGGCGAG  
V P V D V D H Y N V V P F Q F R R A G E  
40  
180  
TACAAGGAGCCGGTGTATCAGGAATCGTTGAGTTGGATGAGGTGAAGTTTGTGTTTCT  
Y K E P V L S G I V E L D E V K F V V S  
60  
240  
CAGTCTGATGCCGCTGAGCAATGGCAACAGTTGACCGCTGAGGACGGCACTGTGTGGCGT  
Q S D A A E Q W Q Q L T A E D G T V W R  
80  
300  
TCAAGAGCGTATCACGGCAAACCTGGGTAAGTACTCTGACATGGCTGTTGGTGCTTTCAAT  
S R A Y H G K L G K Y S D M A V G A F N  
100  
360  
AAGGTGTTGAACCTTGGTCAGAGGGGCCGAAACCTTTGACATTGCCCTGGTGACTTGTGCG  
K V L N L V R G A E T F D I A L V T C A  
120  
420  
TACATTGCCATGTTCTATACACTGTTTAACCTCTTTGCTAGAATGAGGGCAGTCGGCTCT  
Y I A M F Y T L F N L F A R M R A V G S  
140

【0116】

480  
 AAGGTTTGGCTAGGATTGTCAACTCTTGTGTCTCGTTCTTTGCCCTTCTTGTTCACCTG  
 K V W L G L S T L V S S F F A F L F A L  
 160  
 540  
 TACATCACCACGAGGGTGTGGATCTTCAATTCCCTTCCTCTCTTGTCTGAAGGCATT  
 Y I T T R V L D L S I P F L S L S E G I  
 180  
 600  
 CGGTTCTTGTTCGCACTGGTGGTTTCAACAACAAGATTGTGTGGCAGAGAAGGTTTGT  
 P P F V A V V G F M N K I L L A E K V L  
 200  
 660  
 CAAATCAACTCAACGCTCAATCATCGAAGAACGATGCTCCAACCGTTCTGTATCAGGCA  
 Q N Q L N A Q S S K N D A P T V L Y Q A  
 220  
 720  
 TTAAGGGAACAAGGCCCATGCTCTTGCCTGATCACTTGTATTGATTACTGCATTCTTG  
 L R E Q G P L L L R D H L F M I T A F L  
 240  
 780  
 GGATGCTCCTTTTACGCGTCGTACTTGGATGGACTGAAGAAATTTCTGTATATTGGCAGCT  
 G C S F Y A S Y L D G L K M F C I L A A  
 260  
 840  
 CTCATCCCTAGCATTCGATATACTCACCACCTCTACCTTCCTATCTGCAATCTTATCACTC  
 L I L A F D I L T T S T F L S A I L S L  
 280  
 900  
 AAGCTGGAAATTAACCAAATACACAGATCAACGTTGCTGAGAGAACAACCTCGAAGATGAC  
 K L E I N Q I H R S T L L R E Q L E D D  
 300  
 960  
 GGCTTAACCTGAAACCACAGTTGATGATGTTCTCAAATCCAATAGTCTCGCTGGAACCTAAG  
 G L T E T T V D D V L K S N S L A G T K  
 320  
 1020  
 ACTTTCACAGATGCCCATCTACTCTGGTTACAGTTGCCAAGGTTGCTGGTGTTCAGTC  
 T F T D A P S T L V T V A K V A G V S V  
 340  
 1080  
 TTCTTTGGATTGCACCTTTATGGATTTGGATCTGCTTGGCTATCCGATTGAGCGCTGGT  
 F F G L H F Y G F G S A W L S D L S A G  
 360  
 1140  
 AATGAGACAAATGACACTTTACCTTATACGATGCGGTGCGAGATCAAATTCCTATTGGT  
 N E T N D T F T L Y D A V A D Q I P I G  
 380

41

1200  
 TCAAAACGGTACCTTGGTTACTTTATTCCCAACACGTTTCTCTCCCTGAAAACTATCC  
 S N G T L V T L F P T R F F L P E K L S  
 400  
 1260  
 ACACAAATTGAAGCCGTTCTATCATTGCTTATTTCAACTGCTGCCCGTGAT  
 T Q I E A V V L S F I G L I S T A A R D  
 420  
 1320  
 AAATACATCTCAAAATTCATTCTCTTTCGATTTCGCCGTTTCTGCATCCATCAACGCTCTAC  
 K Y I S K F I L F A F A V S A S I N V Y  
 440  
 1380  
 CTTTGAACGTTGCCCGTATCCATACCACAAGATTGGAGGATGCAATCGAATTGAAAAAG  
 L L N V A R I H T T R L E D A I E L K K  
 460  
 1440  
 CCAAGAAGAAAGCTTCGAAGACAGCTGTCAGTCTTCCTAAAGCTGTTGCTTAAAGAT  
 P K K K A S K T A V S V P K A V V V K D  
 480  
 1500  
 TCAGAAACTACAAAATCCTCGGAAATCTTGCACTCATCTTCTGAGAGTGAATCTGAGCAA  
 S E T T K S S E I L H S S S E S E S E Q  
 500  
 1560  
 TCTTCACGTCCACTTGAACAAGTTATTGAGTTATACAAGGATGGTAAAGTTAAGACCCCTT  
 S S R P L E Q V I E L Y K D G K V K T L  
 520  
 1620  
 GTTGACGATGAAGTTGTATCCCTTGTACTGCTGGTAAGTTACCACTGTATGCTCTAGAG  
 V D D E V V S L V T A G K L P L Y A L E  
 540  
 1680  
 AAACAAATTGGGTGATAACTTGAGAGCCGTTGCTATTGTCGGAAGCCATCTCTGATCTT  
 K Q L G D N L R A V A I R R K A I S D L  
 560  
 1740  
 GCAGATGCTCCACTCTTGAGAAGCAATAAATTACCATACTTGCACTATGATTACGATCGT  
 A D A P V L R S N K L P Y L H Y D Y D R  
 580  
 1800  
 GTATTTGGTGCATGTTGTGAAAAATGTTATCGGTTACATGCCATTACCAGTCGGTGTGCGT  
 V F G A C C E N V I G Y M P L P V G V A  
 600

43

1850  
 GGTCATGATTATTGATGGCAAGCCGTACCATATTCCAATGGCAACCACAGAGGGTTGT  
 G P L I I D G K P Y H I P M A T T E G C  
 520  
 1920  
 CTGTGTGCTTCTGCTATGCGTGGTTGTAAAGCCATTAACTTTGGTGGCGGTGTAACAACG  
 L V A S A M R G C K A I N L G G G V T T  
 640  
 1980  
 GTTTTGACTAAAGATGGTATGACGCGTGGACCATGTGTTAAATTCCTCAAGTTTGAAACGA  
 V L T K D G M T R G P C V K F P S L K R  
 660  
 2040  
 GCAGGTCAATGTAAGCTATGGTTGGACTCCGATGAGGGCCAAGAAGAAATGAAGAAAGCC  
 A G Q C K L W L D S D E G Q E E M K K A  
 680  
 2100  
 TTCAACTCTACTTCCAGATTGCCAGACTCCAACATTGCAAACTGCTCTTGGCGGTGAC  
 F N S T S R F A R L Q H L Q T A L A G D  
 700  
 2160  
 TTGTTGTTCATTGGTTTCAGAACCGTCACTGGTGATGCTATGGGTATGAATATGATTTCC  
 L L F I R F R T V T G D A M G M N M I S  
 720  
 2220  
 AAAGGTGTTGAATATGCTCTTAAACAAATGACGGAGGTGTTGGATGGGACGATATGATG  
 K G V E Y A L K Q M T E V F G W D D M M  
 740  
 2280  
 GTTGTTCCTGTTCTGGTAACTACTGTACCGATAAAAAACCAGCTGCTGTTAACTGGATC  
 V V S V S G N Y C T D K K P A A V N W I  
 760  
 2340  
 AATGGTCGTGGTAAAGTGTGTTGCCGAGGCTTCCATACCAAAGGATGCTGTGTTAAA  
 N G R G K S V V A E A S I P K D A V V K  
 780  
 2400  
 GTTTTGAAAAGTCTGTGTTAAAGCTGTTGTTGATGTTAATGTCAACAAGAACTTGATCGGA  
 V L K S S V K A V V D V N V N K N L I G  
 800  
 2460  
 TCAGCTATGGCTGGTAGTGTGGTGGTTCAATGCCCAAGCTGCTAATATGGTTACCGCA  
 S A M A G S V G G F N A Q A A N M V T A  
 820

45

46

2520

GTTTATTTGGCTTTGGGTCAAGATCCAGCCCAAAACGTTGAATCTTCCAACCTGTATTACA  
V Y L A L G Q D P A Q N V E S S N C I T

840

2580

CTAATGACTGAAACGGAGGACGGAGATTGAAAGTTTCTGTTCCATGCCATCTATTGAA  
L M T E T E D G D L K V S V S M P S I E

860

2640

GTCGGAACCATTTGGTGGTGGTACCATCTTGGACCCACAGGGATCCATGCTTGAACCTCTC  
V G T I G G G T I L D P Q G S M L E L L

880

2700

GGAGTACGTGGACCAGCTGATGTTCCAGGAGAAAATGCCCGTCAACTGGCTAAAATCGTT  
G V R G P A D V P G E N A R Q L A K I V

900

2760

GCATCTATTGTTCTTTCCGGTGAATTATCGCTAGTTAGCGCACTTGCAGCTGGTCAATTG  
A S I V L S G E L S L V S A L A A G H L

920

2820

GTGCAGAGTCATATGCAGCACAACAGAGCCGCTGCTAAGAAATAAGCATACGACTCACCA  
V Q S H M Q H N R A A A K K \*

934

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 イソプレノイドの生合成経路を示す。

【図2】 植物常在細菌*Erwinia*および海洋細菌*Agrobacterium aurantiacum*のカロテノイド生合成遺伝子の機能を示す。

【図3】 カロテノイド生合成遺伝子全合成に用いたPCR法の説明図を示す。

【図4】 プラスミドpCLEB113-2の作製法を示す。

【図5】 全合成されたcrtE遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図6】 全合成されたcrtE遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図7】 全合成されたcrtE遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図8】 全合成されたcrtB遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図9】 全合成されたcrtB遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図10】 全合成されたcrtB遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図11】 全合成されたcrtI遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図12】 全合成されたcrtI遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

\* 【図13】 全合成されたcrtI遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図14】 全合成されたcrtI遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図15】 全合成されたcrtY遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図16】 全合成されたcrtY遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図17】 全合成されたcrtY遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図18】 全合成されたcrtZ遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図19】 全合成されたcrtZ遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図20】 全合成されたcrtW遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を示す。

【図21】 全合成されたcrtW遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列（続き）を示す。

【図22】 化学合成した各種DNAセグメントを示す。

【図23】 化学合成した各種DNAセグメントを示す。

【図24】 化学合成した各種DNAセグメントを示す。

【図25】 crtE遺伝子の合成のためのPCR用プライマーを示す。

\* 50 【図26】 crtB遺伝子の合成のためのPCR用プライマー



一を示す。

【図27】 crtI遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

一を示す。

【図28】 crtI遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

一を示す。

【図29】 crtY遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

一を示す。

【図30】 crtY遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

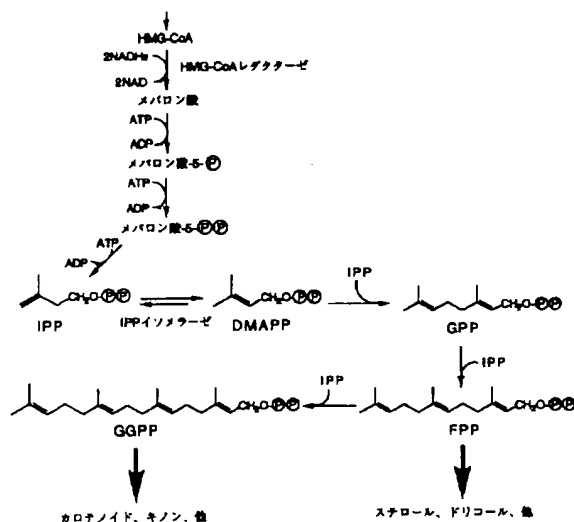
一を示す。

【図31】 crtZ遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

一を示す。

【図32】 crtW遺伝子の合成のためのPCR用プライマ

【図1】



【図28】

I-5-2C

CTGTCCTCTCAACTTTGGACCCCTGACAGTCCAGTCAAGTTAGCAGTAACCAAGTGTGGAACCTGGAGCCAAGACGT

I-6-1

TTGGTTAACCACAGAAATGTTACCCGATTGGATTTCAGAGACCAATTGAACGCTTACCACGGTTCTGCTTTCTCCGTCGA

I-6-1C

CCTTAGATCTGTGATCAAAATCCTCCAACATCAAAACAGCAGTAGCCTTAGCGGAACCGATAACAACCTGGGATACCAAG

C

I-6-2

CGGTTCCTGCTTTCTCCGTCGAGCCAGTTTGAATCAATCCGCTTGGTTTCAGACCAACACAGAGACAAGACCATCACC

I-6-2C

GATAACACCTGGGATACAGACCTGGGTGAGTACCAGCACCAGCAAGTACAAGTTGGTGATGGTCTTGTCTCTGTTG

一を示す。

【図33】 プラスミドpCLR1EBI-3の作製法を示す。

【図34】 プラスミドpCRAL10EBIY-3の作製法を示す。

【図35】 プラスミドpCLEIZ1の作製法を示す。

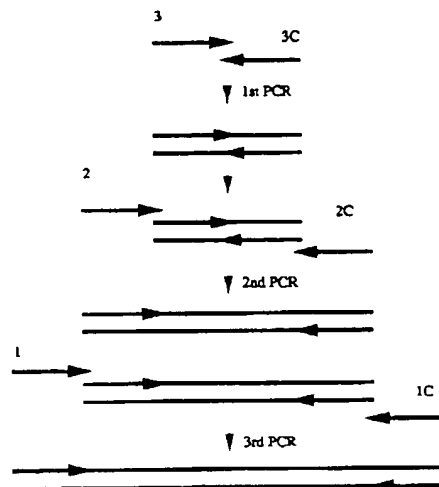
【図36】 プラスミドpCLBWY1の作製法を示す図。

【図37】 *Saccharomyces cerevisiae*のHMG-CoA レダクターゼ (全長)のアミノ酸配列を示す。

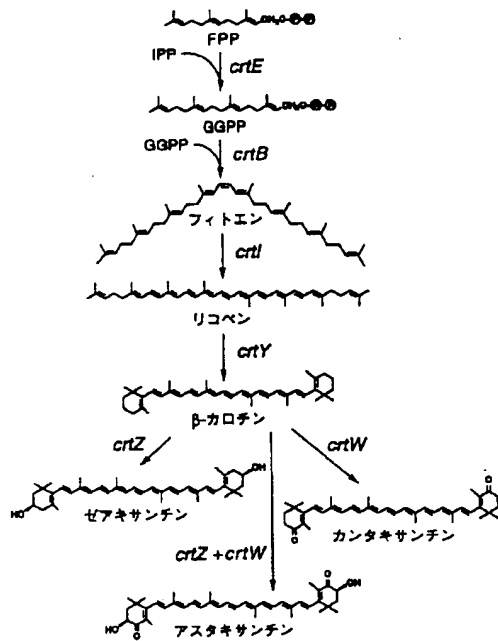
【図38】 プラスミドpChGRHの作製法を示す。

10 【図39】 各種リコペン生産株のリコペン生産量を示す。

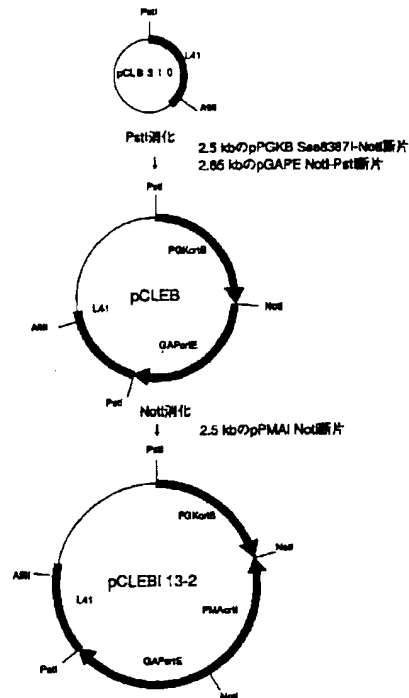
【図3】



【図2】



【図4】



【図7】

TTG TTG GGT CCA AGA GCT GTC GAG GAG AGA TTG AGA CAA CAC TTG CAA  
 Leu Leu Gly Pro Arg Ala Val Glu Glu Arg Leu Arg Gln His Leu Gln>

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865  
 \* \* \* \* \*

TTG GCT TCC GAG CAC TTG TCC GCT GCT TGT CAA CAC GGT CAC GCT ACC  
 Leu Ala Ser Glu His Leu Ser Ala Ala Cys Gln His Gly His Ala Thr>

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915  
 \* \* \* \* \*

CAA CAC TTC ATC CAA GCC TGG TTC GAC AAG AAG TTG GCT GCT GTT TCT  
 Gln His Phe Ile Gln Ala Trp Phe Asp Lys Lys Leu Ala Ala Val Ser>

920 925  
 \*

TAG TAG ATC TGG  
 \*\*\*

【図39】

Strain	Lycopene (% / Dry cell weight)
12-2	0.11
h-3	0.45
h-8	0.44
h-17	0.40

## 【図5】

5    10    15    20    25    30    35    40    45    50  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GGTCTAGAT ATG ACC GTT TGT GCT AAG AAG CAC GTT CAC TTG ACC AGA GAC  
 Met Thr Val Cys Ala Lys Lys His Val His Leu Thr Arg Asp>

55    60    65    70    75    80    85    90    95  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT GCT GAG CAA TTG TTG GCT GAC ATC GAC AGA AGA TTG GAT CAA TTG  
 Ala Ala Glu Gln Leu Leu Ala Asp Ile Asp Arg Arg Leu Asp Gln Leu>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 TTG CCA GTC GAG GGT GAG AGA GAC GTT GTT GCT GCT GCT ATG AGA CAC  
 Leu Pro Val Glu Gly Glu Arg Asp Val Val Gly Ala Ala Met Arg Glu>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GGT GCT TTG GCT CCA GGT AAG AGA ATC AGA CCA ATC TTG TTG TTG TTG  
 Gly Ala Leu Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Met Leu Leu Leu Leu>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 ACT GCT AGA GAC CTT GGT TGT GCT GTC TCC CAC GAC GGT TTG TTG GAT  
 Thr Ala Arg Asp Leu Gly Cys Ala Val Ser His Asp Gly Leu Leu Asp>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 TTG GCT TGT GCT GTT GAG ATG GTT CAC GCT GCT TCC TTG ATC TTG GAC  
 Leu Ala Cys Ala Val Glu Met Val His Ala Ala Ser Leu Ile Leu Asp>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .    .    .    .    .    .    .  
 GAT ATG CCA TGT ATG GAC GAC GCT AAG TTG AGA AGA GGT AGA CCA ACC  
 Asp Met Pro Cys Met Asp Asp Ala Lys Leu Arg Arg Gly Arg Pro Thr>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .    .    .    .    .    .    .  
 ATC CAC TCT CAC TAC GGT GAG CAC GTC GCT ATC TTG GCT GCT GTT GCT  
 Ile His Ser His Tyr Gly Glu His Val Ala Ile Leu Ala Ala Val Ala>

## 【図6】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 . . . . .  
 TTG TTG TCT AAG GCT TTC GGT GTT ATC OCT GAT GCT GAC GGT TTG ACC  
 Leu Leu Ser Lys Ala Phe Gly Val Ile Ala Asp Ala Asp Gly Leu Thr>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 . . . . .  
 CCA TTG OCT AAG AAC AGA GCT GTC TCC GAG CTC TCT AAC GCT ATC GGT  
 Pro Leu Ala Lys Asn Arg Ala Val Ser Glu Leu Ser Asn Ala Ile Gly>

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530  
 . . . . .  
 ATG CAA GGT TTG GTT CAA GGT CAA TTC AAG GAC TTG TCC GAG GGT GAT  
 Met Gln Gly Leu Val Gln Gly Gln Phe Lys Asp Leu Ser Glu Gly Asp>

535 540 545 550 555 560 565 570 575  
 . . . . .  
 AAG CCA AGA TCC GCT GAG OCT ATC TTG ATG ACT AAC CAC TTC AAG ACC  
 Lys Pro Arg Ser Ala Glu Ala Ile Leu Met Thr Asn His Phe Lys Thr>

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625  
 . . . . .  
 TCC ACC TTG TTC TGT GCT TCC ATG CAA ATG GCT TCC ATC GTT GCT AAC  
 Ser Thr Leu Phe Cys Ala Ser Met Gln Met Ala Ser Ile Val Ala Asn>

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675  
 . . . . .  
 GCT TCC TCT GAG GCT AGA GAC TGT TTG CAC AGA TTC TCT TTG GAT TTG  
 Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asp Cys Leu His Arg Phe Ser Leu Asp Leu>

680 685 690 695 700 705 710 715 720  
 . . . . .  
 GGT CAA GCT TTC CAA TTG TTG GAT GAC TTG ACC GAT GGT ATG ACC GAC  
 Gly Gln Ala Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Asp Gly Met Thr Asp>

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770  
 . . . . .  
 ACT GGT AAG GAC TCT AAC CAA GAT GCT GGT AAG TCC ACT TTG GTT AAC  
 Thr Gly Lys Asp Ser Asn Gln Asp Ala Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn>

775 780 785 790 795 800 805 810 815  
 . . . . .

## 【図8】

5    10    15    20    25    30    35    40    45    50  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AATCTAGAA ATG AAC AAC CCA TCC TTG TTG AAC CAC GCT GTT GAG ACC ATG  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met>

55    60    65    70    75    80    85    90    95  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT GTT GGT TCC AAG TCT TTC GCT ACC GCT TCC AAG TTG TTC GAC GCT  
 Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AAG ACT AGA AGA TCC GTC TTG ATG TTG TAC GCT TGG TGT AGA CAC TGT  
 Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GAC GAT GTT ATC GAC GAC CAA ACC TTG GCT TTC CAA GCT AGA CAA CCA  
 Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT TTG CAA ACT CCA GAG CAA AGA TTG ATG CAA TTG GAG ATG AAG ACT  
 Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AGA CAA GGC TAC GCT GGT TCC CAA ATG CAC GAG CCA GCT TTC GCT GCT  
 Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 TTC CAA GAG GTT GCT ATG GCT CAC GAT ATC GCT CCA GCT TAC GCT TTC  
 Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GAT CAC TTG GAG GGT TTC GCT ATG GAC CTC AGA GAG GCT CAA TAC TCC  
 Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser>

【図9】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 CAA TTG GAC GAC ACC TTG AGA TAC TGT TAC CAC GTT GCT GGT GTC GTT  
 Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 GGT TTG ATG ATG GCT CAA ATC ATG GGT GTC AGA GAT AAC GCT ACC TTG  
 Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu>

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530  
 GAC AGA GCT TGT GAC TTG GGT TTG GCT TTC CAA TTG ACT AAC ATC GCT  
 Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala>

535 540 545 550 555 560 565 570 575  
 AGA GAC ATC GTT GAC GAC GCT CAC GGT GGT AGA TGT TAC TTG CCA GCT  
 Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala>

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625  
 TCC TGG TTG GAG CAC GAG GGT TTG AAC AAG GAG AAC TAC GCT GCT CCA  
 Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro>

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675  
 GAG AAC AGA CAA GCT TTG TCC AGA ATC GCT AGA AGA TTG GTT CAA GAG  
 Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu>

680 685 690 695 700 705 710 715 720  
 GCT GAG CCA TAC TAC TTG TCC GCT ACC GCT GGT TTG GCT GGT TTG CCA  
 Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro>

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770  
 TTG AGA TCC GCT TGG GCT ATC GCT ACC GCT AAG CAA CTC TAC AGA AAG  
 Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys>

775 780 785 790 795 800 805 810 815

## 【図10】

ATC GGT GTT AAG GTT GAG CAA GCT GGT CAA CAA GCC TCG GAC CAA AGA  
 Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg>

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865  
 . . . . .  
 CAA TCT ACT ACC ACC CCA GAG AAG TTG ACT TTG TTG TTG GCT GCT TCC  
 Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser>

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915  
 . . . . .  
 GGT CAA GCC TTG ACC TCC AGA ATG AGA GCT CAC CCA CCA AGA CCA GCT  
 Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala>

920 925 930 935 940 945  
 . . . . .  
 CAC TTG TCG CAA AGA CCA TTG TAG CAG ATC TAA  
 His Leu Trp Gln Arg Pro Leu \*\*\*

## 【図19】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 . . . . .  
 AGA GAC CAC TGT GTT TCT TTC GGT TTC ATC TAC GCT CCA CCA GTT GAT  
 Arg Asp His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 . . . . .  
 AAG TTG AAG CAA GAC TTG AAG ATG TCC GGT GTC TTG AGA GCT GAG GCT  
 Lys Leu Lys Gln Asp Leu Lys Met Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala>

485 490 495 500 505  
 . . . . .  
 CAA GAG AGA ACC TAG TAG ATC TGG  
 Gln Glu Arg Thr \*\*\* >

## 【図11】

5    10    15    20    25    30    35    40    45    50  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AATCTAGAT ATG AAG CCA ACC ACT GTT ATC GGT GCT GGT TTC GGT GGT TTG  
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu>

55    60    65    70    75    80    85    90    95  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GGT TTG GGT ATC AGA TTG CAA GCT GCT GGT ATC CCA GTC TTG TTG TTG  
 Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GAG CAA AGA GAC AAG CCA GGT GGT AGA GCT TAC GTT TAC GAG GAC CAA  
 Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GGT TTC ACC TTC GAT GCT GGT CCA ACC GTC ATC ACT GAC CCA TCC GGT  
 Gly Phe Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 ATC GAG GAG TTG TTC GCT TTG GGT GGT AAG CAA TTG AAG GAG TAC GTT  
 Ile Glu Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GAG CTC TTG CCA GTC ACC CCA TTC TAC AGA TTG TGT TGG GAG TCC GGT  
 Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AAG GTC TTC AAC TAC GAC AAC GAT CAA ACT AGA TTG GAG GCT CAA ATC  
 Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 CAA CAA TTC AAC CCA AGA CAC GTC GAG GGT TAC AGA CAA TTC TTG GAC  
 Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp>



## 【図12】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 . . . . .  
 TAC TCC AGA GCT GTT TTC AAG GAG GGT TAC TTG AAG TTG GGT ACT GTT  
 Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 . . . . .  
 CCA TTC TTG TCT TTC AGA GAT ATG TTG AGA GCT GCT CCA CAA TTG GCT  
 Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala>

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530  
 . . . . .  
 AAG TTG CAA GCC TGG AGA TCC GTA TAC TCC AAG GTT GCT TCC TAC ATC  
 Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile>

535 540 545 550 555 560 565 570 575  
 . . . . .  
 GAG GAC GAG CAC TTG AGA CAA GCC TTC TCC TTC CAC TCT TTG TTG GTC  
 Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val>

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625  
 . . . . .  
 GGT GGT AAC CCA TTC GCT ACC TCC TCC ATC TAC ACC TTG ATC CAC GCT  
 Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala>

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675  
 . . . . .  
 TTG GAG AGA GAG TGG GGT GTT TGG TTC CCA AGA GGT GGT ACT GGT GCT  
 Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala>

680 685 690 695 700 705 710 715 720  
 . . . . .  
 TTG GTC CAA GGT ATG ATC AAG CTT TTC CAA GAC TTG GGT GGT GAG GTT  
 Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val>

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770  
 . . . . .  
 GTC TTG AAC GCT AGA GTT TCT CAC ATC GAG ACC ACT GGT AAC AAG ATC  
 Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile>

775 780 785 790 795 800 805 810 815  
 . . . . .

## 【図13】

CAG GCT GTC CAC TTG GAG GAT GGT AGA AGA TTC TTG ACC CAA GCT GTT  
Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val>

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865  
GCT TCC AAC GCT GAT GTC GTT CAC ACC TAC AGA GAC TTG TTG TCC CAA  
Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln>

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915  
CAC CCA GCT GCT GTC AAG CAA TCC AAC AAG TTG CAA ACT AAG AGA ATC  
His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met>

920 925 930 935 940 945 950 955 960  
TCT AAC TCC TTG TTC GTT TTG TAC TTC GGT TTG AAC CAC CAC CAC GAT  
Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp>

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010  
CAA TTG GCT CAC CAC ACC GTC TGT TTC GGT CCA AGA TAC AGA GAG CTC  
Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu>

1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055  
ATC GAG GAG ATT TTC AAC CAC GAC GGT TTG GCT GAG GAC TTC TCC TTG  
Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu>

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105  
TAC TTG CAC GCT CCA TGT GTT ACC GAT TCC TCT TTG GCT CCA CAC GCT  
Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly>

1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155  
TGT GGT TCC TAC TAC GTC TTG GCT CCA GTT CCA CAC TTG GGT ACT GCT  
Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala>

1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200  
AAC TTG CAC TCG ACT GTC GAG GGT CCA AAG TTG AGA GAC AGA ATC TTC  
Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe>

## 【図14】

1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250  
 . . . . .  
 GCT TAC TTG GAG CAA CAC TAC ATG CCA GGT TTG AGA TCC CAA TTG GTT  
 Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val>

1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295  
 . . . . .  
 ACC CAC AGA ATG TTC ACC CCA TTC GAT TTC AGA GAC CAA TTG AAC GCT  
 Thr His Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala>

1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345  
 . . . . .  
 TAC CAC GGT TCT GCT TTC TCC GTC GAG CCA GTT TTG ACT CAA TCC GCT  
 Tyr His Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala>

1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395  
 . . . . .  
 TGG TTC AGA CCA CAC AAC AGA GAC AAG ACC ATC ACC AAC TTG TAC TTG  
 Trp Phe Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu>

1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440  
 . . . . .  
 GTC GGT GCT GGT ACT CAC CCA GGT GCT GCT ATC CCA GGT GTT ATC GGT  
 Val Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly>

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490  
 . . . . .  
 TCC GCT AAG GCT ACT GCT GGT TTG ATG TTG GAG GAT TTG ATC TGA CAG  
 Ser Ala Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile \*\*\* >

1495  
 ATC TAA  
 >

## 【図15】

5    10    15    20    25    30    35    40    45    50  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 AATCTAGAT ATG CAA CCA CAC TAC GAC TTG ATC TTG GTT GGT GCT GGT TTG  
 Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu>

55    60    65    70    75    80    85    90    95  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT AAC GGT TTG ATC GCT TTG AGA TTG CAA CAA CAA CAA CCA GAC ATG  
 Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 AGA ATC TTG TTG ATC GAC GCT GCT CCA CAA GCT GCT GCT AAC CAC ACC  
 Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 TGG TCC TTC CAC CAC GAC GAC TTG ACC GAG TCC CAA CAC AGA TGG ATC  
 Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT CCA TTG GTT GTC CAC CAC TGG CCA GAC TAC CAA GTT AGA TTC CCA  
 Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 ACT AGA AGA AGA AAG GTT AAC TCC GGT TAC TTC TGT ATC ACC TCT CAA  
 Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .    .    .    .    .    .    .  
 AGA TTC GCT GAG GTT TTG CAA AGA CAA TTC GGT CCA CAC TTG TGG ATG  
 Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GAT ACC GCT GTT GCT GAG GTC AAC GCT GAG TCC GTT AGA TTG AAC AAG  
 Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys>

## 【図16】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 . . . . .  
 GGT CAA GTT ATC GGT GCT AGA GCT CTC ATC GAC GGT AGA GGT TAC GCT  
 Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 . . . . .  
 GCT AAC TCC GCT TTG TCT GTT GGT TTC CAA GCC TTC ATC GGT CAA GAG  
 Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu>

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530  
 . . . . .  
 TGG AGA TTG TCC CAC CCA CAC GGT TTG TCC TCC CCA ATC ATC ATG GAC  
 Trp Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp>

535 540 545 550 555 560 565 570 575  
 . . . . .  
 GCT ACT GTC GAC CAA CAA AAC GGT TAC AGA TTC GTT TAC TCC TTG CCA  
 Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro>

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625  
 . . . . .  
 TTG TCC CCA ACC AGA TTG TTG ATC GAG GAC ACC CAC TAC ATC GAC AAC  
 Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn>

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675  
 . . . . .  
 GCT ACT TTG GAC CCA GAG TGT GCT AGA CAA AAC ATC TGT GAC TAC GCT  
 Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala>

680 685 690 695 700 705 710 715 720  
 . . . . .  
 GCT CAA CAA GGT TGG CAA CTC CAA ACT TTG CTC AGA GAG GAG CAA GGT  
 Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly>

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770  
 . . . . .  
 GCT TTG CCA ATC ACT TTG TCT GGT AAC GGT GAC GGT TTC TGG CAA CAA  
 Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln>

775 780 785 790 795 800 805 810 815  
 . . . . .

## 【図17】

AGA CCA TTG GCT TGT TCC GGT TTG AGA GCT GGT TTG TTC CAC CCA ACT  
Arg Pro Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr>

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865  
.  
ACC GGT TAC TCC TTG CCA TTG GCT GTT GCT GTC GCT GAT AGA TTG TCC  
Thr Gly Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser>

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915  
.  
GCC TTG GAC GTT TTC ACC TCC GCT TCT ATC CAC CAC GCT ATC ACC CAC  
Ala Leu Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His>

920 925 930 935 940 945 950 955 960  
.  
TTC GCT AGA GAG AGA TGG CAA CAA CAA GCT TTC TTC AGA ATC TTG AAC  
Phe Ala Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn>

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010  
.  
AGA ATC TTG TTC TTG GCT GGT CCA GCT GAC TCC AGA TGG AGA GTT ATC  
Arg Met Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met>

1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055  
.  
CAA AGA TTC TAC GGT TTG CCA GAG GAC TTG ATC GCT AGA TTC TAC GCT  
Gln Arg Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala>

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105  
.  
GGT AAG TTG ACC TTG ACT GAC AGA TTG AGA ATC TTG TCC GGT AAG CCA  
Gly Lys Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro>

1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155  
.  
CCA GTC CCA GTT TTC GCT GCT TTG CAA GCT ATC ATC ACT ACC CAC AGA  
Pro Val Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr His Arg>

1160 1165  
.  
TAA TAG ATC TGG  
...>

## 【図18】

5     10     15     20     25     30     35     40     45     50  
 .     .     .     .     .     .     .     .     .  
 GGTCTAGAT ATG ACC AAC TTC TTG ATC GTT GTC GCT ACC GTT TTG GTT ATG  
 Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met>

55     60     65     70     75     80     85     90     95  
 .     .     .     .     .     .     .     .  
 GAG TTG ACT GCT TAC TCC GTC CAC AGA TGG ATC ATG CAC GGT CCA TTG  
 Glu Leu Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .     .     .     .     .     .     .     .     .  
 GGT TGG GCT TCC CAC AAG TCC CAC CAC CAC GAG CAC CAC CAC GCT TTG  
 Gly Trp Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .     .     .     .     .     .     .     .  
 GAG AAG AAC GAC TTG TAC GGT TTG GTT TTC GCT GTT ATC GCT ACC GTC  
 Glu Lys Asn Asp Leu Tyr Gly Leu Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .     .     .     .     .     .     .     .  
 TTG TTC ACC GTT GGT TGG ATC TGG GCT CCA GTT TTG TGG TGG ATC GCT  
 Leu Phe Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .     .     .     .     .     .     .     .  
 TTG GGT ATG ACT GTC TAC GGT TTG ATC TAC TTC GTT TTG CAC GAT GGT  
 Leu Gly Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val Leu His Asp Gly>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .     .     .     .     .     .     .  
 TTG GTC CAC CAA AGA TGG CCA TTC AGA TAC ATC CCA AGA AAG GGT TAC  
 Leu Val His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys Gly Tyr>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .     .     .     .     .     .     .  
 GCT AGA AGA TTG TAC CAA GCT CAC AGA TTG CAC CAC GCT GTC CAC GGT  
 Ala Arg Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly>

## 【図20】

5    10    15    20    25    30    35    40    45    50  
 .    .    .    .    .    .    .    .    .  
 GGTCTAGAT ATG TCC GCT CAC GCT TTG CCA AAG GCT GAC TTG ACT GCT ACC  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr>

55    60    65    70    75    80    85    90    95  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 TCC TTG ATC GTC TCC GGT GGT ATC ATC GCT GCT TGG TTG GCT TTG CAC  
 Ser Leu Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His>

100    105    110    115    120    125    130    135    140    145  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GTT CAC GCT TTG TGG TTC TTG GAC GCT GCT GCT CAC CCA ATC TTG GCT  
 Val His Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala>

150    155    160    165    170    175    180    185    190    195  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 ATC GCT AAC TTC TTG GGT TTG ACC TGG TTG TCT GTC GGT TTG TTC ATC  
 Ile Ala Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile>

200    205    210    215    220    225    230    235    240  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 ATC GCT CAC GAC GCT ATG CAC GGT TCC GTT GTC CCA GGT AGA CCA AGA  
 Ile Ala His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg>

245    250    255    260    265    270    275    280    285    290  
 .    .    .    .    .    .    .    .  
 GCT AAC GCT GCT ATG GGT CAA TTG GTT TTG TGG TTG TAC GCT GGT TTC  
 Ala Asn Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe>

295    300    305    310    315    320    325    330    335  
 .    .    .    .    .    .    .  
 TCT TGG AGA AAG ATG ATC GTT AAG CAC ATG GCT CAC CAC AGA CAC GCT  
 Ser Trp Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala>

340    345    350    355    360    365    370    375    380    385  
 .    .    .    .    .    .    .  
 GGT ACT CAT CAC CAC CCA CAT TTC CAC CAC GGT GGT CCA GTT AGA TGG  
 Gly Thr Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp>



## 【図21】

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435  
 . . . . .  
 TAC GCT AGA TTC ATC GGT ACT TAC TTC GGT TGG AGA GAG GGT TTG TTG  
 Tyr Ala Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu>

440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 . . . . .  
 TTG CCA GTC ATC GTT ACC GTT TAC GCT TTG ATC TTG GGT GAC AGA TGG  
 Leu Pro Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp>

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530  
 . . . . .  
 ATG TAC GTT GTC TTC TGG CCA TTG CCA TCC ATC TTG GCT TCT ATC CAA  
 Met Tyr Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln>

535 540 545 550 555 560 565 570 575  
 . . . . .  
 TTG TTC GTT TTC GGT ACC TGG TTG CCA CAC AGA CCA GGT CAC GAC GCT  
 Leu Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala>

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625  
 . . . . .  
 TTC CCA GAC AGA CAC AAC GCT AGA TCC TCC AGA ATC TCT GAT CCA GTT  
 Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val>

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675  
 . . . . .  
 TCC TTG TTG ACC TGT TTC CAC TTC GGT GGT TAC CAC CAC GAG CAC CAC  
 Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His>

680 685 690 695 700 705 710 715 720  
 . . . . .  
 TTG CAC CCA ACT GTC CCA TGG TGG AGA TTG CCA TCC ACC AGA ACC AAG  
 Leu His Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys>

725 730 735 740 745  
 . . . . .  
 GGT GAC ACC GCT TAG TAG ATC TCG  
 Gly Asp Thr Ala \*\*\* >

## 【図22】

E-1

GGCTAGATATGACCGTTTGTGCTAAGAAGCAAGTTCACTTGACAGAGACGCTGAGCAATTGTTGGCTGACATCGA  
CAGAAAGATTGGATCAATTGTTGCCAGTGGAGGGTGAGAGAGACGTTGTTGGTCTGCTATGAGAGAGGGTGTCTTGGCTCCA  
GGTAAGAGAAATCAGACCAATGTTGTTGTTGTTGACTGCTAGAGACCTTGGAA

E-2

AACTTGGTTGTGCTGTCTCCACGACCGTTTGTGGATTGGCTTGTGCTGTTGAGATGGTTCAAGCTGCTTCTTGATCT  
TGGACGATATGCCATGTATGGAGGACCTAAGTTGAGAAGAGGTAGACCAACCATCCACTCTCACTAAGGTGAGCAAGTGG  
CTATCTTGGCTGCTGTTGTTGTTGTTCTAAGGCTTGGGTGTTATGGCTGATGCTGACGGTTTGACCCCATTTGGCTAAGAAC  
AGAGCTGTCTCCGAGCTAA

E-3

AAGAGCTCTCTAACCTATCGGTATGCAAGGTTTGGTTCAAGGTCAATTCAAGGACTTGTCCGAGGGTGATAAGCCAAAGA  
TCCGCTGAGGGCTATCTTGATGACTAACCACTTCAAGAGCTCCACTTGTCTGTGCTTCCATGCCAAATGGCTTCCATCGTTG  
CTAACCGTCTCTGAGGCTAGAGACTGTTGACACAGATTCTCTTGGATTGGGTCAAGCTTAA

E-4

CGAAGCTTCCAAATTGTTGGATGACTTGACCGATGGTATGACCGACACTGGTAAGGACTCTAACCAAGATGCTGGTAAGT  
CCACTTGTGTTAACTTGTGGGTCCAAGAGCTGTGGAGGAGAGATTAGACAACACTTCAATTGGCTTCCGAGCACTTGTG  
GCTGCTGTGCAACAGGTCACCTACCCAAACACTTCAATCCAGCTGGTTCGACAAGAGTTGGCTGCTGTTCTTAGTAG  
ATCTGG

B-1

AATCTAGAAATGAACAACCCATCCTTGTGTAACCACGCTGTTGAGACCATGGCTGTGGTTCCAAAGTCTTCCGTACCGC  
TTCCAAAGTTGTTGCAAGCTAAGACTAGAAGATCCGTCCTGATGTTGTACCGTTGGTGTAGACACTGTCAGCATGTTATCGAC  
GACCAAACTTGGGTTTCCAAAGCTAGACAACCACTTGGCAAACTCCAGAGCAAAAGATTGATGCAATTGGAGATGAAGACT  
AGACAACCCATCCGCTGGTTCCCAAAATGCAAGAGGACGCTTTCGCTGCTTTCCAAGAGGTGCTATGGCTCAAGATATCAA

B-2

AAGATATCGCTCCAGCTTACGCTTTCGATCACTTGGAGGGTTTCGCTATGGAGCTCAGAGAGGCTCAATACTCCCAATTG  
GACGACACCTTGAAGATACTGTTACCAGTTGCTGGTGTGCTTGGTTGATGATGGCTCAAAATCAGGTTGTCAGAGATAACG  
CTACCTTGGACAGAGCTTGTGACTTGGGTTTGGCTTTCCAATTGACTAACATCCCTAGAGACATCGTTGACGACGCTCACGC  
TGGTAGATGTTACTTCCAGCTTCTGTTGGAGCAAGAGGGTTTGAACAAGGAGAACTACGCTGCTCCAGAGAACAGACA  
AAGCTTAA

B-3

TTAAGCTTGTCCAGAAATCGCTAGAAAGATTGGTTCAAGAGGCTGAGCCATCTACTTGTCCGCTACCGCTGTTTGGCTG  
GTTTCCCATTTGAGATCCGCTTGGGCTATCGCTACCGCTAAGCAAAGTCTACAGAAAGATCGGTGTTAAGGTTGAGCAAGCTG  
GTCAACAAGGCTGGGACCAAGACAATCTACTACCAACCCAGAGAAAGTTGACTTGTGTTGGCTGCTTCCGCTCAAGGCT  
TGACCTCCAGAAATGAGAGCTCACCCACCAAGACCACTCACTTGTGGCAAGACCAATTGTAGCAGATCTAA

I-1

TTAATCTAGATATGAAGCCAACCACTGTATCGGTGCTGGTTTCGGTGGTTTGGCTTTCGCTATCAGATTGCAAGCTGCTG  
GTATCCCATGCTTGTGTTGGAGCAAGAGACAAGCCAGGTGGTAGAGCTTACGTTTACGAGGACCAAGGTTTCACTTCCG  
ATGCTGCTCAACCGCTCACTGACCCATCCGCTATCGAGGAGTTGTTGCTTTCGCTGGTAAGCAATTGAAGGAGTACGT  
TGAGCTCTT

I-2

TTGAGCTCTTCCAGTCAACCCATTCTACAGATTGTTTGGAGTCCGGTAAGGTCTTCAACTACGACAACGATCAAACT  
AGATTGGAGGCTCAAAATCCAAATTCACCCAAAGAGAGCTCGAGGGTTACAGACAATCTTGGACTACTCCAGAGCTGTT

## 【図23】

TTCAAGGAGGGTACTTGAAGTTGGTACTGTTCCATTCTTCTTTTCAGAGATATGTTGAGAGCTCTCCACAAATGGCTAA  
GTTGCAAGCTGGAGATCGGTATACTT

I-3

TTGTATACTCCAAGGTTGCTTCTACATCGAGGACGAGCACTTGAGACAAGCCTTCTCTTCCACTCTTTGTTGGTGGTG  
GTAAOCCATTCGCTACCTCTCCATCTACACCTTGATCCACGCTTGGAGAGAGAGTGGGTGTTTGGTTCCCAAGAGGTGG  
TACTGGTCTTTGGTCCAAGGTATGATCAAGCTTGG

I-4

GGAAAGCTTTTCCAAGACTTGGGTGGTGAGGTTGCTTGAACGCTAGAGTTTCTCAGATGGAGACCACTGGTAACAAGATC  
GAGGCTGTCCACTTGGAGGATGGTAGAAGATTCTTGACCCAAGCTGTTGCTTCCAAGCTGATGCTGTTCAACCTACAGA  
GACTTGTGTTGCCAACACCCAGCTGCTGTTCAAGCAATCCAACAAGTTGCAAACTAAGAGAAATGTCTAACTGCTTGTTCGTTT  
TGTACTTCGGTTTGAACCAACCACACGATCAATTGGCTCACCAACGCTGTTTGGTCCAAGATACAGAGAGCTCTT

I-5

TTGAGCTCATCGACGAGATTTTCAACCACGAGGTTTGGCTGAGGACTTCTCTTGTACTTGCACGCTCCATGTTTACC  
GATTCTCTTTGGCTCCAGAGGTTTGGTTGCTACTACGTTCTGGCTCCAGTTCCACACTTGGTACTGCTAACTTGGACTG  
GACTGTGAGGTTCCAAAGTTGAGAGACAGAATCTTGGCTTACTTGGAGCAACACTACATGCCAGGTTTGAGATCCCAATT  
GGTTACCTT

I-6

TTGGTTACCCACAGAATGTTACCCCATTCGATTTTCAGAGACCAATTGAACGCTTACCAAGGTTCTGCTTCTCCGTCGA  
GCCAGTTTTCAGCTCAATCCGCTTGGTTTCAGACCCACACAACAGAGACAAGACCAACCAACTTGTACTTGGTGGTGGTGG  
TACTACCCAGGTTGGTATCCCAAGTGTATCCGTTCCGCTAAGGCTACTGCTGGTTTGAATGTTGGAGGATTTGATCTGA  
CAGATCTAAGG

Y-1

AATCTAGATATGCCAACCACTACGACTTGTCTTGGTTGCTGCTTGGCTAACGGTTTGTATCCCTTTGAGATTGCCAA  
CAACAACAACAGACATGAGAACTTGTGATCGACGCTGCTCCACAAGCTGGTGGTAACCAACCTGGTCTTCCACCCAC  
GACGACTTGAAGGAGTCCCAACAGATGGATCGCTCCATTGGTTGTCCCAACCTGGCCAGACTACCAAGTTAGATTCCCA  
ACTAGAAGAAGAAAGCTTGG

Y-2

GGAAAGCTTAACTCCGGTTACTTCTGTATCACTCTCAAGATTCCGTGAGGTTTTCGCAAGACAATTCGGTCCACACTTG  
TGGATCGATACCGCTGTTGCTGAGGTCAACGCTGAGTCCGTTAGATTGAAGAAGGGTCAAGTTATCGGTGCTAGAGCTGTCA  
TGGACGGTAGAGGTTACCGTCTAACTCCGCTTGTCTGTTGGTTTCCAAGCCTTCATCGGTCAAGAGTGGAGATTGTCCCA  
CCCACACGGTTTGTCTCCCAATCATCATGACGCTACTGTGACAAA

Y-3

AAGTCGACCAACAAAAGGTTACAGATTGCTTACTCTTGGCATTGTCCCAACAGATTGTTGATCGAGGACACCCA  
CTACATCGACAAAGCTACTTTGGACCCAGAGTGTCTAGACAAAACATCTGTGACTACCGTCTCAACAAGGTTGGCAACT  
CCAAACTTGTCTCAGAGAGGAGCAAGGTGCTTGGCAATCACTTTGTCTGGTAACGCTGACGCTTCTGCGCAACAAGACC  
ATTGGCTTGTTCGGTTTGGAGAGCTGGTTTGTTCACCAACTACCGGTTACTCTTGGCATTGGCTGTTGCTGTGCTGATA  
GATTGTCCGGCTTGGTT

Y-4

TTCTTGGACGTTTTCACCTCCGCTTCTATCCACCAAGCTATCACCACTTGGCTAGAGAGAGATGGCAACAACAAGGTT  
TCTTCAGAAATGTTGAACAGAATGTTGTTCTTGGCTGTTCCAGCTGACTCCAGATGGAGAGTTATGCAAGATTCTACGGTTT  
GCCAGAGGACTTGTATCGCTAGATTCTACGCTGGTAAGTTGACCTTGACTCAGAGATTGAGAATCTTGTCCGCTAAGCCACC  
AGTCCAGTTTGTGCTGCTTTCGAAGCTATCATGACTACCCACAGATAATAGATCTGG

## 【図24】

Z-1

GGTCTAGATATGACCAACTTCTTGATCGTTGTGGCTACCGTTTGGTTATGGAGTTGACTGCTTACTCGGTCCACAGATGG  
ATCATGCAACGGTCCATTGGGTTGGGGTTGGCACAAGTCCACCAAGGAGCAGCAACCGCTTTGGAGAAGAACGACTT  
GTACGGTTTGGTTTGGCTGTTATCGCTACCGTCTTGTTCACCGTTGGTTGGATCTGGGCTCCAGTTTGTGGTGGATCGCTT  
GGGTATGACTGTCTACGG

Z-2

CCGTCTACGGTTTGATCTACTTGGTTTGCACGATGGTTTGGTCCACCAAGATGCCCCATTGAGATACATCCCAAGAAAG  
GGTTACGCTAGAAAGATTGTACCAAGCTCAGAGATTGCCACCGCTGTGGAGGCTACAGACCACTGTGTTCTTTGGGTTTCA  
TCTACGCTCCACCAAGTTGATAAGTTGAAGCAAGACTTGAAGATGTCCGGTGTCTTGAGAGCTGAGGCTCAAGAGAGAACCT  
AGTAGATCTCG

W-1

GGTCTAGATATGTCCGCTCACGCTTTGCCAAAGGCTGACTTGACTGCTACCTCCTTGATCGTCTCCGGTGGTATCATCGC  
TGCTTGGTTGGCTTTGCAAGTTTCAAGCTTTGTGGTTCTTGGACGCTGCTGCTCACCAATCTTGGCTATCGCTAACTTCTTGG  
GTTTGACCTGGTTGTCTGTCCGTTTGTTCATCATCGCTCACGACGCTATGCACCGTTCCGTTGTGCCAGGTAGACGGAAGCT  
TGCC

W-2

GGCCAAAGCTTGGGTAGACCAAGAGCTAACCGTCTATGGGTCAATTGGTTTGTGGTTGTACGCTGGTTTCTCTTGAGA  
AAGATGATCGTTAAGCAGATGGCTCACCAAGAGACAGCGTGGTACTGATGAGGACCCAGATTTCGACCAAGGTGGTCCAGTT  
AGATGGTACCGTAGATTCTGGTACTTACTTGGTTGGCAGAGAGCGGTTTGTGTGCCAGTCACTGTTACCGTTTAAAGCTTT  
GATCTTGGGTGACAGATGGATGTACGTTGTCTTCTGGCCATTGCCATCCATCTTGGCTTCTATCCAAATTGTTCGTTTTCGTA  
CCGGT

W-3

CCTGGTACCTGGTTGCCACACAGACCGGTACGACGCTTCCAGACAGACACACCGCTAGATCTCCAGAACTCTCTG  
ATCCAGTTTCCCTTGTGACCTGTTTCCACTTCGGTGGTTACCAACGAGCAACCACTTGCACCCAACTGTCCATGGTGGAG  
ATTGCCATCCACCAAGCAAGGCTGACACCGCTTAGTAGATCTGG

## 【図30】

Y-4-1C

CCAGATCTATTATCTGTGGTAGTCATGATAGCTTGCAAAGCAGGCCAAAAGTGGAGCTGTGGCTTACCGGACAAGATT  
TCAATCTGTCA

Y-4-1

CAACAAGGTTTCTTCAAGATGTTGAACAGAAATGTTGTTCTTGGCTGGTCCAGCTGACTCCAGATGGAGATTATGCAAA  
ATTCTACGGTTTG

Y-4-2C

GACAAGATTCTCAATCTGTCTAGTCAAGGTCAACTTACCAGCGTAGAAATCTAGCGATCAAGTCTCTTCCAAAACCGTAGA  
ATCTTTGCATAAC

## 【図25】

E-1-F1  
GGTCTAGATATGACCGTTTGTGCTAAGAAGCAGCTTCACTTGACCAGACGCTGCTGAGCAATTGTTGCTGAC  
E-1-F2  
CGCTGCTGAGCAATTGTTGGCTGACATCGACAGAAGATTGGATCAATTGTTGCCAGTGAGGGTGAGAGAGAGCT  
E-1-R1  
TTCCAAGGTCTCTAGCAUTCAACAACAACAACATTGGTCTGATTCTCTTAAGCTGGAGCCAAGCACCCCTCTCTCA  
E-1-R2  
ACCTGGAGCCAAAGCAOCCCTCTCTCATAGCAGCAACCAACAAGTCTCTCTCACCCCTCGACTGGCAACAATTGATCC  
E-2-F1  
AACCTTGGTTGTGCTGCTCCACGACCGTTTGTGGATTGGCTTGTGCTGTTGAGATGGTTCAGGCTGCTTCTTGATCT  
TGGACG  
E-2-F2  
GTTCAAGCTGCTTCTTGTATCTTGGACDATATGCCATGTATGGACGACGCTAAGTTGAGAAGAGCTAGACCAACCATCCA  
CTCTCAA  
E-2-R1  
TTGAGCTCGGAGACAGCTCTGTTCTTAGCCAATGGGGTCAAAAGCTCAGCATCAGCGATAACACCGAAAGCCTTAGACA  
ACAAAGCAA  
E-2-R2  
ACACCGAAAGCCTTAGACAACAAAGCAACACGACCAAGATAACGACGCTGCTCACCGTACTGAGAGTTGATGGTTGGT  
CTACCTC  
E-3-F1  
AAGAGCTCTCTAAAGCTATCGGTATGCAAGGTTTGGTTCAAGGTCAATTCAAGGACTTGTCCGAGGCTGATAAGCCA  
E-3-F2  
AGGACTTGTGCGAGGGTGATAAGCCAAGATCCGCTGAGGCTATCTTGATGACTAACCACTTCAAGAGCTCCACCTTGT  
E-3-R1  
TTAAGCTTGACCCAAATCCAAGAGAACTGTGCAAAACAGTCTCTAGCCTCAGAGGAAGCGTTAGCAACGATGGAAG  
E-3-R2  
ACAGGAAGCGTTAGCAACGATGGAAGCCATTGCAATGGAAGCACAGAAACAAGGTGGAGGTCTTGAAGTGGTTAGTCAT  
E-4-F1  
GGAAGCTTTCCAATTGTTGGATGACTTGACCGATGGTATGACCGACACTGGTAAGGACTCTAACCAAGATGCTGGTAAGT  
CCA  
E-4-F2  
CTCTAACCAAGATGCTGGTAAGTCCACTTTGGTTAACTTGTGGGTCCAAGAGCTGTGAGGAGAGATTGAGACAACACT  
T  
E-4-R1  
CCAGATCTACTAAGAAACAGCAGCCAACCTTCTGTCGAACCAAGGCTTGGATGAAGTGTGGGTAGCGTGACCGTGTGA  
CAA  
E-4-R2  
TTGGGTAGCGTGACCGTGTGACAAGCAGCGGACAAAGTCTGGGAAGCCAATTGCAAGTGTGCTCAATCTCTCTCGA  
C

## 【図26】

B-1-1  
 AATCTAGAAATGAACAAACCACTCTTGTGAAACACCGCTTTGAGACCATGGCTGTGGTTCCAAAGTCTTTCCCTACCGC  
 TTCCAAAGTTGTTGACGGC  
 B-1-1R  
 TTGATATCGTGAACCATAGCAACCTCTTGGAAACACCGGAAAGCTGGCTCGTGCATTTGGGAACACCGTAGCGTTGTCT  
 AGTCTTCATCTCCAATTG  
 B-1-2  
 GCTTCCAAAGTTGTTGACGCTAAGACTAGAAGATCGCTCTTGATGTTGTACGCTTGGTGTAGACACTGTGACGATGTTATC  
 GACGACCAAAACCTTG  
 B-1-2R  
 CTAGTCTTCATCTCCAATTGCATCAATCTTGTCTGGAGTTTGCAAAGCTGGTGTCTAGCTTGGAAACCAAGGTTTGG  
 TCGTCGATAACATCG  
 B-2-1  
 AAGATATCGCTCCAGCTTACGCTTTGATCACTTGGAGGGTTTCGCTATGGACGTCAGAGAGGCTCAATACTCCAATTG  
 GACGACACCTTGAGATACT  
 B-2-1R  
 TTAAGCTTGTCTGTTTCTTGAGCAGCGTAGTCTCTGTTTCAAAACCTCGTCTCCAAACCAAGGAGCTGGCAAGTAAC  
 ATCTACACGCGTGACGCTC  
 B-2-2  
 GGACGACACCTTGAGATACTGTTACCAAGTTGCTGGTGTGTTGTTGATGATGGCTCAATCATGGTGTGAGAGATA  
 ACCCTACCTTGGACAGAGC  
 B-2-2R  
 CATCTACACGCGTGAGCGTGGTCAACGATGTTCTTAGCGATGTTAGTCAATTGGAAAGCCAAACCAAGTCAACAAGCTC  
 TGCCAAAGGTAGCGTTATCT  
 B-3-1  
 TTAAGCTTTGTCCAGAACTGCTAGAAGATTGGTTCAAGAGCGCTGAGCCATACTACTTGTCCGCTACCGCTGTTTGGCTG  
 GTTGGCAATTGAGATCGG  
 B-3-1R  
 TTAGATCTGCTACAATGCTCTTGGCAACAGTGAGCTGGTCTTGGTGGTGAGCTCTCATTTCTGGAAGTCAAGGCTTGAC  
 CGGAAGCAGCCAAACAACA  
 B-3-2  
 TGGTTTGGCAATTGAGATCCGCTTGGGCTATCGCTACCGCTAAGCAAGTCTACAGAAAGATCGGTGTTAAGGTTGAGCAAG  
 CTGGTCAACAAGGCTG  
 B-3-2R  
 ACCGGAAGCAACCAACAACAAGTCAACTCTCTGGGGTGGTAGTAGATTGCTTTTGGTCCAGGCTTGTGACCAAGCTT  
 GCTCAACCTTAACACC

## 【図31】

Z-1-F1  
 GGTCTAGATATGAACAACTTCTTGATCGTTGTCCCTACCGTTTGGTTATGCAAGTTGACTGCTTACTCCCTCCACAGATGG  
 ATCATGCAACGGTCC  
 Z-1-F2  
 TCCACAGATGGATCATGCAACGCTCCATTGGGTTGGGTTGGCACAAGTCCCAACGAGGAGCAGACCAAGCTTTGG  
 Z-1-R1  
 CCGTAGACAGTCAACCAAGCGATCCACCAAACTGGAGGCCAGATCCAAACCAAGGTGAACAAGACGCTAGCG  
 ATAACAGCGAAAACCAA  
 Z-1-R2  
 CGGTAGCGATAACAGCGAAAACCAAAACGTAAGTGGTTCTTCTCCAAAGCGTGGTGTCTCTGTTGGTGGGACT  
 Z-2-F1  
 CCGTCTACGGTTTGATCTACTTGGTTTGCAGATGGTTGGTCCAAAGATGGCCATTGAGATACATCCCAAGAAAG  
 CGTTACCGTAGAAGA  
 Z-2-F2  
 CCCAAGAAAGGTTACGCTAGAAGATTGTACCAAGCTCACAGATTGCCACCAAGCTGTGGAGGTTAGAGACCACTG  
 Z-2-R1  
 CCAGATCTACTAGGTTCTCTCTTGAAGCTCAGCTCTCAAGACACGGACATCTTCAAGTCTTGTCTCAACTTATCAACTG  
 GTGGAGCGTAGATGA  
 Z-2-R2  
 TTATCAACTGGTGGAGCGTAGATGAAACCGAAAGAAACAAGTGGTCTCTACCTCGACAGCGTGGTCCAATCTG

1-1-1  
TTAATCTAGATATGAAGCCAAACCACTGTTATCGGTGCTGGTTTCGGTGGTTTCGGCTTTGGCTATCAGATTCCAAAGCTCTGTC

G

1-1-1C  
AAGAGCTCAAAGTACTCTCTCAATTGCTTACCAGCCAAAGCGAACAACTCTCGATAGCGGATGGGTCAGTGATGACGG

TTG

1-1-2  
TCAGATTGCAAGCTCTGGTATCCAGTCTTGTGTGTGGAGCAAAGAGACAAGCCAGGTGGTAGAGCTTACGTTT

1-1-2C  
GGGTCAGTGATGACGGTTGGACCAAGCATCGAAGGTGAAACCTTGGTCTCTGTAACGTAAAGCTTACCACTGOC

1-2-1  
TTGAGCTCTTCCAGTCAACCCATTCTACAGATTGTGTGGGAGTCCGGTAAGGTCTTCAACTACGACAACGATCAAAT

AGATTG

1-2-1C  
AAGTATACGGATCTCCAGGCTTCCAACTTACCCAAATTGTGGAGCAGCTCTCAACATATCTCTGAAAGACAAGAAATGGAA

CAGTAAC

1-2-2  
CGACAAGCATCAAACCTAGATTGGAGGCTCAAATCCAAATTTCAACCAAGAGACGTGGAGGGTTACAGACAAATCTTG

GACT

1-2-2C  
AAGACAAGAATGGAACAGTACCCAACTTCAAGTAACCTCTTGAAAAACAGCTCTGGAGTAGTCCAAAGAAATGTCTGTGA

ACCC

1-3-1  
TTGTATACTCCAAAGGTTGCTTCTACATCGAGGACGAGCACTTGAGACAAGGCTTCTCTTCCACTC

1-3-1C  
CCAAGCTTGATCATACCTTGGACCAAAGCAACGATACCACTCTTGGGAACCAAACACCCCACTC

1-3-2  
CAAGGCTTCTCTTCCACTCTTGTGTGGTGGTGAACCCATTGCTACCTCTCCATCTACA

1-3-2C  
GAACCAAACACCCCACTCTCTCTCCAAAGGTTGGATCAAGGTGTAGATGAGGAGGTAGCGAAT

1-4-1  
CGAAGCTTTTCCAAGACTTGGGTGGTGAAGGTTGTCTTGAAGGCTAGAGTTTCTCAGATGGAGACCACTGGTAACAAGATC

GAGGCTGTCCACTTGGAG

1-4-1C  
AAGAGCTCTCTGTATCTTGGACCGAAACAGACGGTGTGGTGAAGCAATTGATCTGGTGGTGGTTCAAAACCGAAGTACA

AAACGAACAAGGAGTTAGA

1-4-2  
ATCGAGGCTGTCCACTTGGAGGATGGTAGAAGATTCTTGACCCAAAGCTGTGTCTTCCAAGCTGATGTGTTCAACCTA

CAGAGACTTGTGTCCC

1-4-2C  
CAAAACGACAAGAGATTAGACATTCTCTTGTGTTGCAACTGTGTGGATTGCTTGACAGCAGCTGGGTGTGGGACAACA

AGTCTCTGATGGTGTGA

1-5-1  
TTGAGCTCATCGACGAGATTTCAACCACGACGGTTTGGCTGAGGACTTCTCTTGTACTTGCACGCTOCATGTGTTAAC

GA

1-5-1C  
AAGGTAACCAATTGGGATCTCAACCTCGCATGTAGTGTGCTCCAAGTAAGCGAAGATTCTGTCTCTCAACTTTGGAC

CT

1-5-2  
TGCACGCTCCATGTGTACCGATTCTCTTTGGCTCCAGAGGGTGTGGTTCCTACTAAGTCTTGGCTCCAGTTCC

## 【図29】

Y-1-1

AATCTAGATATGCAACACACTACGACTTGATCTTGGTTGGTCTGGTTTGGCTAACGGTTTGATCGCTTTGAGATTGCA

Y-1-1C

CCAAGCTTCTCTCTCTAGTTGGGAATCTAAGTTGGTAGTCTGGCCACTGGTGGACAACCAATGGAGCGATCCATCTGTG

Y-1-2

TTGATCGCTTTGAGATTGCAACAAACAACACAGACATGAGAATCTTGTGATCGAAGCTGCTGCAAGCTGGTGGTAA  
C

Y-1-2C

AATGGAGCGATCCATCTGTGTTGGGACTGGGTCAAGTCTGGTGGGAAGGACAGGTGTGTTACCAACAGCTTGTGG  
A

Y-2-1

GGAAAGCTTAAGTCCGGTTACTTCTGTATCACTCTCAAGATTGGCTGAGGTTTTCGAAAGACAAATCGGTCCACACTTG  
TGGATGGATAC

Y-2-1C

TTGTGACAGTAGTACCGTCCATGATGATTGGGGAGGACAAACGGTGTGGTGGGACAAATCTCCACTCTTGACCGATGAAGG  
CTTCGAAACCAA

Y-2-2

CCCACTTGTGGATCGATACCGCTGTTGCTGAGGTCAACGGCTGAGTCCGTTAGATTGAAGAAGGGTCAAGTTATCGGTGC  
TAGAGCT

Y-2-2C

GATGAAGGCTTGGAAACCAACAGACAAAGCGGAGTTAGCAAGCTAACCTCTACCGTGGATGACAGCTCTAGCACCGAT  
AACTTGACC

Y-3-1

AAGTCGACCAACAAACGGTTACAGATTGGTTTACTCCTTGCCATTGTCCCAACAGATTGTTGATCGAGGACACCCA  
CTACATCGACAAAGCTACTTT

Y-3-1C

AACCAAGCGCGGACAAATCTATCAGCGACAACCAACGCAATGGCAAGGAGTAACCGGTAGTTGGTGGAAACAAACGAGC  
TCTCAACCGGAACAAGCCAAT

Y-3-2

TACATCGACAAAGCTACTTTGGACCCAGAGTGTGCTAGACAAAACATCTGTGACTACGCTGCTCAACAAGGTTGGCAAC  
TCCAAACTTTGCTCAGAGAGG

Y-3-2C

TCAAAACCGGAACAAGCCAATGGTCTTTGTTGCCAGAAAGGTCAGGGTACCAGACAAAGTGATTGGCAAGCACCTTG  
CTCCTCTCTGAGCAAGTTTG

Y-4-1

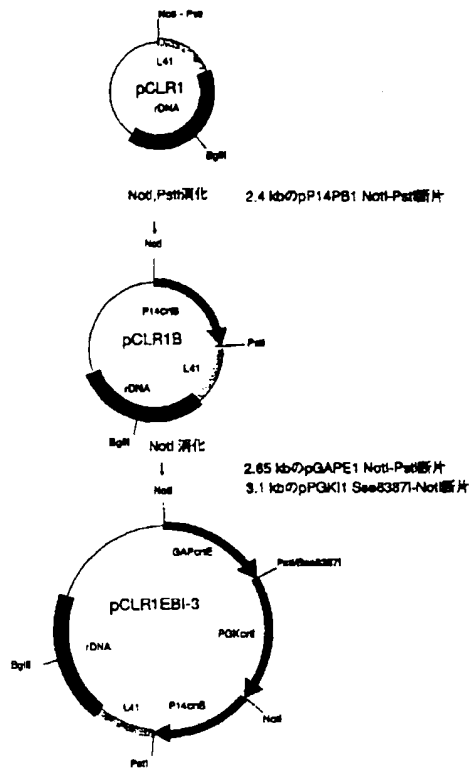
TTCTTGGACGTTTTCACTCCGGTTCTATCCACCAGCTATCACCCACTTCGCTAGAGAGAGATGGCAACAAAGGTT  
TCTTCAGAAATG



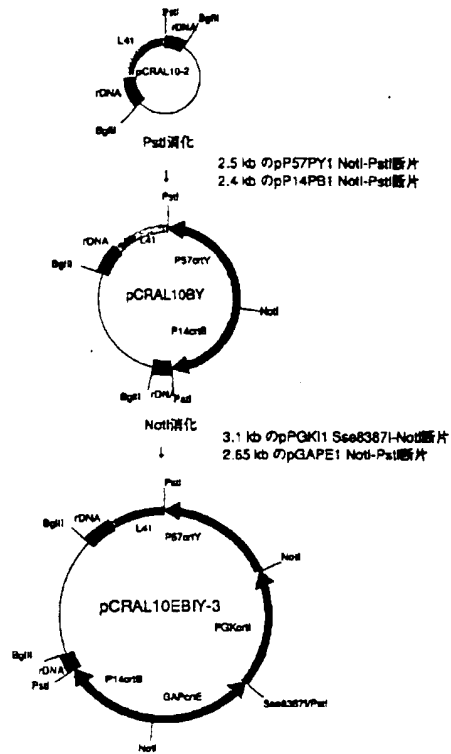
## 【図32】

F1-1  
TTATCAACTGGTGGAGCGTAGATGAAACGAAAGAAACACAGTGGTCTCTACCCCTGGACAGCGTGGTCCAATCTG  
F1-2  
GTCTCCGGTGGTATCATGGCTGCTTGGCTTGGCTTTCACGTTACGCTTTGTGGTTCTTGGACGCTGCTGCTCACCCAAATC  
TTGG  
F2-1  
GGCCAAAGCTTGGGTAGACCAAGAGCTAACGCTGCTATGGGTCAATTGGTTTGTGGTTGTACGCTGGTTTCTCTT  
F2-2  
TTGTGGTTGTACGCTGGTTTCTCTTGGAGAAAGATGATCGTTAAGCACATGGCTCACACAGACAGCTGGTACTGATGA  
F2-3  
ACCCAGACACGCTGGTACTGATGACGACCCAGATTTCGACCAAGGTGGTCCAGTTAGATGGTACGCTAGATTCAATCGG  
T  
F3-1  
CCTGGTACCTGGTTGCCACACAGACCAAGTCACGACGCTTTCCAGACAGACACAACGCTAGATCTCCA  
F3-2  
GACAGACACAACGCTAGATCCTCCAGAAATCTCTGATCCAGTTTCTTGTGGACCTGTTTCCACTTGGTGGTTAC  
R1-1  
GGCCAAAGCTTCCGTCTACCTGGGACAACGGAAACGCTGCATACGCTCGTGAGCGATGATGAACAACCGACAGACAACC  
AGGTCAA  
R1-2  
ACAAAACGACAGACAACAGGTCAAACCAAGAAAGTTAGCGATAGCCAAGATTGGGTGAGCAGCAGCGTCCAAGAACC  
ACAAAGC  
R2-1  
ACCGGTACCGAAAACGAAACAATTGGATAGAAAGCAAGATGGATGGCAATGGCCAGAAGACAAGTTACATCCATCT  
R2-2  
TTGTGGTTGTACGCTGGTTTCTCTTGGAGAAAGATGATCGTTAAGCACATGGCTCACACAGACAGCTGGTACTGATGA  
R2-3  
GATGACTGGCAACAACAACCTCTCTCCAAACGAAAGTAAGTACCGATGAATCTAGCGTAACATCTAACTGGAACACCG  
T  
R3-1  
CCCAGATCTACTAAGCGGTGTCAACCTTGGTTCTGGTGGATGGCAATCTCCACCATGGGACAGTTGGGTG  
R3-2  
ATCTCCACCATGGGACAGTTGGGTGCAAGTGGTGGTGGTGGTAACCAACGAAAGTGGAAACAGGTCAACAAGG

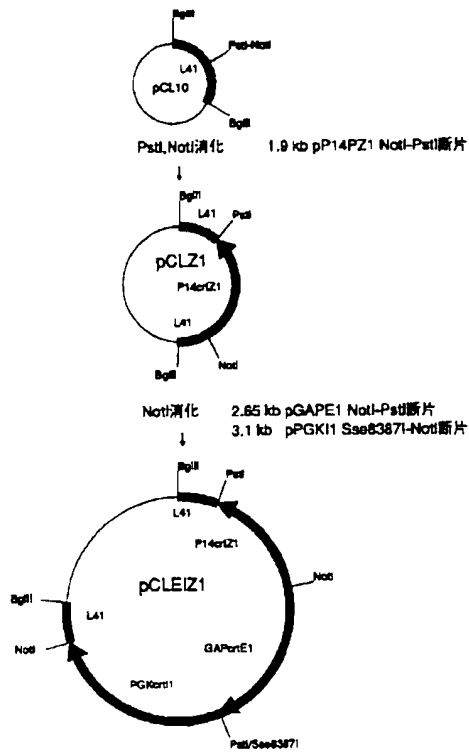
【図33】



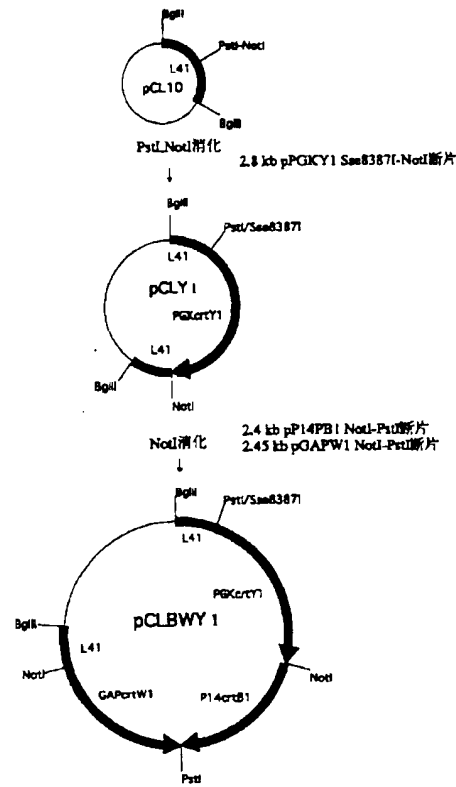
【図34】



【図35】



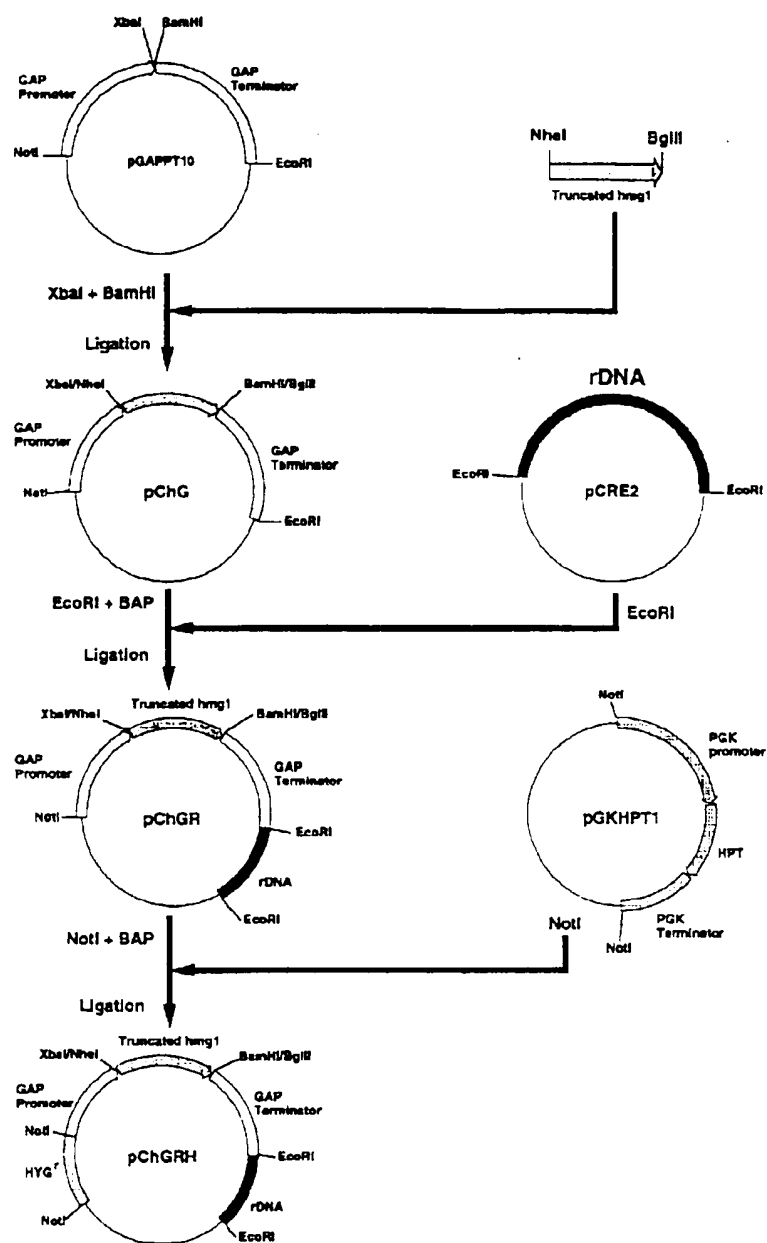
【図36】



## 【図37】

1 60  
 MPPLFKGLKQMAKPIAYVSRFSAKRPIHIILFSLIISAFAYLSVIQYYFNGWQLDSNSVF  
 120  
 ETAPNKDSNTLQECSHYYRDSSLDGWVSITAHEASELPAPHYLLNLNFNNSPNETDSI  
 180  
 PELANTVFEKDNTKYILQEDLSVSKEISSTDGTXWRLRSDRKSLFDVKTLAYSLYDVFS  
 240  
 NVTQADPFVLMVTAYLMMFYTIFGLFNDMRKTGSNFWLSASTVVNSASSLFLALYVTQ  
 300  
 CILGKEVSALTLEGLPFIVVVVGFKHKIKIAQYALEKFERVGLSKRITTDEIVFESVSE  
 360  
 EGGRLIQDHLLCIFAFIGCSMYAHQLKTLTNFCILSAPILIFELILTPTFYSAILALRLE  
 420  
 MNVIHRSTIIKQTEEDGVVPSTARIISKAEEKSVSSFLNLSVVVIIMKLSVILLFVFIN  
 480  
 FYNFGANWVNDAFNSLYFDKERVSLPDFITSNASENFKEQAIVSVTPLLYKPIKSYQRI  
 540  
 EDMVLLLLRNVSVAIRDRFVSKLVLSALVCSAVINVYLLNAARIHTSYTADQLVKTEVTK  
 600  
 KSFTAPVQKASTPVLTKNTVIGSKVKSLSSAQSSSSGPSSSSEEDDSRDIESLDKKIRP  
 660  
 LEELEALLSSGNTKQLKNKEVAALVIHGKLFYALEKKLGDTRAVAVRRKALSILAEAP  
 720  
 VLASDRLPYKNYDYDRVFGACCENVIGYMPLPVGVIPLVIDGTSYHIPMATTEGCLVAS  
 780  
 AMRGCKAINAGGGATTVLTKDGMTRGPVVRPPTLKRSGACKIWLDSEEGQNAIKKAFNST  
 840  
 SRFARLQHIQTCLAGDLLFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYSLKQMVVEYGWEDMEVVS  
 900  
 SGNICTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEATIPGDVVRKVLKSDVSALVELNIAKNLVGSAMA  
 960  
 GSVGGFNAHAANLVTAVFLALGQDPAQNVSSNCITLMKEVDGDLRISVSMPSIEVGTIG  
 1020  
 GGTVLEPQGAMLDLLGVGRPHATAPGTNARQLARIVACAVLAGELSLCAALAAGHLVQSH  
 1054  
 MTHNRKPAEPTKPNNLDATDINRLKDGSVTCIKS

【図38】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

//(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 1/19

識別記号

ZNA

F I

C12R 1:72)  
(C12P 7/04  
C12R 1:72)

(72)発明者 近藤 恵二

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟  
醸造酒株式会社基盤技術研究所内